

**VERGLEICHENDE ZELLZYKLUSANALYTISCHE
UNTERSUCHUNGEN AN MENSCHLICHEN
VOLLBLUTKULTUREN**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

**Erlangung der Doktorwürde
vorgelegt dem Fachbereich Biologie
der Freien Universität Berlin**

von

Dipl.-Biol. Gertrud Dudin
aus Berlin

1977

VERGLEICHENDE ZELLZYKLUSANALYTISCHE UNTERSUCHUNGEN AN
MENSCHLICHEN VOLLBLUTKULTUREN

I N A U G U R A L - D I S S E R T A T I O N

zur

Erlangung der Doktorwürde
vorgelegt dem Fachbereich Biologie
der Freien Universität Berlin

von

Dipl.-Biol. Gertrud Dudin

aus Berlin



Erster Referent:

Prof.Dr. G. Obe

Zweiter Referent:

Prof.Dr. K. Sperling

Tag der Promotion:

31. JAN. 1977

I N H A L T

I.	EINLEITUNG	4
II.	MATERIAL UND METHODEN	24
III.	ERGEBNISSE	37
IV.	DISKUSSION	99
V.	ZUSAMMENFASSUNG	120
VI.	LITERATUR	121
VII.	TABELLEN	148
VIII.	FILMPROTOKOLL	180

I. EINLEITUNG

Eine Methode zur Darstellung von Mitosen aus Lymphozyten wurde erstmal 1960 von MOORHEAD et al. beschrieben. ARAKAKI und SPARKES (1963) wandelten die Methode so ab, daß nur noch 0,05 - 0,2 ml Blut für eine Kultur benötigt wurden. Damit war ein einfaches System zur Kultivierung menschlicher Zellen geschaffen, das vor allen anderen Kulturmethoden die Vorteile hat, daß wenig Zellmaterial benötigt wird und dieses einfach zu beschaffen ist.

Die Blutkulturmethode wird in der Zytogenetik, der Immunologie, der Virologie und der Pharmakologie verwendet.

In der Vollblutkultur befinden sich alle Zelltypen des Blutes: Lymphozyten, Monozyten, Granulozyten (eosinophile, neutrophile, basophile), Thrombozyten und Erythrozyten.

CARSTAIRS (1962) wies nach, daß in der Blutkultur die kleinen Lymphozyten mitotisch aktiv sind.

Die Lymphozyten stellen 25% aller Zellen im Blut dar, davon sind 98% kleine Lymphozyten ($1500 / \text{mm}^3$ Blut). Die kleinen Lymphozyten haben einen Durchmesser von weniger als $10 \mu\text{m}$. Ihr Kern ist rundlich und mit Einkerbungen versehen. Er färbt sich auffallend dunkel, da das Chromatin stark kondensiert (heterochromatisch) ist. Das Zytoplasma bildet einen schmalen granulafreien Saum um den Zellkern.

Die meisten kleinen Lymphozyten können für Monate oder Jahre im Kreislauf verbleiben ohne ihre DNS zu replizieren oder sich mitotisch zu teilen. Sie verharren im G_0 -Stadium des Zellzyklus. Durch Inkubation von Venenblut mit Tritium-markiertem Thymidin wiesen BOND et al. (1958) nach, daß nur etwa 0,06% Zellen im Blut von gesunden Menschen ihre DNS replizieren.

Die Kultivierung der kleinen Lymphozyten wurde erst möglich nach der Entdeckung von NOWELL (1960), daß Phytohämagglutinin (ein Extrakt aus *Phaseolus vulgaris*) diese Zellen zur Teilung anregt. Etwa zur gleichen Zeit wurde bekannt, daß Lymphozyten auch durch Antigene in vitro stimulierbar sind. Die Aktivierung der kleinen Lymphozyten durch Mitogene ist also mit einer Antigen - Antikörperreaktion vergleichbar.

Untersuchungen über die Kultur von Lymphozyten in vitro setzen daher eine genaue Kenntnis der Funktion der kleinen Lymphozyten in vivo voraus. Diese Funktion soll hier zuerst beschrieben werden.

Danach wird die Stimulierung der kleinen Lymphozyten durch Mitogene beschrieben.

Die kleinen Lymphozyten des Menschen, die im Licht- und im Elektronenmikroskop morphologisch gleichartig sind (ALEXANDER und WETZEL, 1975; ALEXANDER et al., 1976), stellen funktionell eine heterogene Zellpopulation dar. Die Determination der funktionellen Heterogenität wird bereits während der Histogenese der kleinen Lymphozyten festgelegt. Stammzellen aus dem Knochenmark gelangen entweder direkt als kleine Lymphozyten ins Blut (bone-marrow-derived = B-Lymphozyten) oder über das Blut in den Thymus und von dort als kleine Lymphozyten wieder ins Blut (thymus-derived = T-Lymphozyten). Das Blut transportiert die kleinen Lymphozyten zu den peripheren lymphatischen Geweben, wo sie sich einnisten.

SILVEIRA et al. (1972) identifizierten die T- und B-Lymphozyten im menschlichen Blut aufgrund ihrer Fähigkeiten, Schäferythrozyten (E) (T-Lymphozyten) oder Erythrozyten-Antikörper-Mäusekomplement (EAC) (B-Lymphozyten) zu binden. Die Prozentangaben über T- und B-Lymphozyten im menschlichen Blut sind unterschiedlich und differieren je nach der verwendeten Nachweismethode. Es besteht auch eine Abhängigkeit des T/B-Wertes vom Alter des Spenders (WILSON und NOSSAL, 1971; AUGENER et al., 1974; GAJL-PECZALSKA et al., 1974; RABIN und WHITESIDE, 1974; SMITH et al., 1974; STEEL et al., 1974; DIAZ-JOUANEN et al., 1975; STEEL et al., 1975).

Alle Lymphozyten des peripheren Blutes scheinen Antikörper auf ihrer Oberfläche zu tragen (BIBERFELD et al., 1971; HOGG und GREAVES, 1972; HUDSON et al., 1974).

Antikörper sind γ -Globuline. Man nennt sie ihrer Funktion wegen Immunglobuline (Ig). Beim Menschen kommen drei Immunglobulintypen vor: IgG, IgM und IgA. Die Immunglobulinmoleküle bestehen aus leichten und schweren Polypeptidketten (PORTER-Diagramm: IgG = 2 leichte -MG 20.000- und 2 schwere -MG 50.000- Polypeptidketten sind durch Disulfidbindungen zu einer Y-förmigen Struktur verbunden). Im N-Terminal der leichten Kette wurden zahlreiche Unterschiede bei Ig-Molekülen gefunden. Auf den leichten Ketten basiert der antigene Charakter der Antikörper, d.h. ihre Zuordnung zu einem bestimmten Antigen. Die Anzahl der nachgewiesenen Typen von Antikörpern ist bereits unüberschaubar.

Auf der Oberfläche von menschlichen B-Lymphozyten wiesen ABDOU und

ABDOU (1973) Immunglobuline nach. Es sind vor allem IgM-Moleküle mit schweren μ -Ketten, an die Mannose und Glukosamine gebunden sind (MELCHERS und ANDERSSON, 1973). Jeder B-Lymphozyt trägt etwa 10^4 - 10^5 Immunglobulinmoleküle auf seiner Oberfläche. Alle Immunglobulinrezeptoren auf einem individuellen B-Lymphozyten haben dieselbe Konfiguration der Bindungsorte und damit dieselbe antigene Spezifität.

Die T-Lymphozyten besitzen ebensoviele Immunglobuline wie die B-Lymphozyten (MARCHALONIS und CONE, 1973; MARCHALONIS, 1975). Diese sind jedoch schwerer nachweisbar, weil sie nicht allein als T-Zell-Rezeptoren dienen. Es werden hauptsächlich Produkte der Immunreaktionsgene (Ir-Gene) als T-Zell-Rezeptoren angenommen (RAFF, 1973; MARX, 1976). Die T-Lymphozyten scheinen mindestens zwei "Erkennungssysteme" zu haben, die Ig-Rezeptoren und die Ir-Genprodukte. Welches Erkennungssystem bei Kontakt mit einem Antigen reagiert, richtet sich nach dem Antigen und der Suopopulation der T-Lymphozyten (RAFF, 1973).

Im Laufe der Entwicklung werden vom Körper Lymphozyten erzeugt, die sich durch ihren charakteristischen Antikörperverband unterscheiden. Der jeweilige Antikörper ist in der Lage, fremde Antigene mit einer spezifischen Molekularstruktur zu binden. Die meisten Lymphozyten unterscheiden sich also in der Spezifität ihrer Antikörper, und auf ein spezifisches Antigen reagiert daher nur ein kleiner Anteil der Lymphozyten, maximal 0,02% (MELCHERS und ANDERSSON, 1973; EDELMAN, 1976). Diese reagierenden Lymphozyten stellen einen Zellklon mit identischen Antikörpern dar. Man schätzt die Zahl der verschiedenen Lymphozytenklone auf 10^5 - 10^6 (FORD, 1973). Die Existenz solcher Klone wurde durch folgende Versuche nachgewiesen: Man bot Lymphozyten ein stark radioaktives Antigen an. Diejenigen Zellen, die dieses Antigen gebunden hatten, wurden durch die Strahlung abgetötet. Die Folge war, daß gegen das gleiche Antigen keine Antikörper mehr gebildet werden konnten, da der dafür spezifische Lymphozytenklon abgetötet war (MACKER, 1974). Ein weiterer Hinweis auf solche Lymphozytenklone ist, daß nach Exposition auf zwei verschiedene Antigene ein additiver Effekt auf die DNS-Syntheserate nachgewiesen wurde (MÜLLER und NOBORU KASHIWAGI, 1972).

Mit derartigen Untersuchungen wird zugleich auch die Theorie der klonalen Selektion gestützt, die auf P. EHRLICH im Jahre 1900 zurückgeht und von BURNET in ihrer heutigen Form formuliert wurde.

Die Klon-Selektionstheorie besagt (BURNET, 1973):

"Stammzellen bilden infolge zufälliger somatischer Mutation unterschiedliche Immunmuster aus, und zwar jeweils nur eines pro Zelle und Klon. Kontakt mit dem korrespondierenden Antigen bewirkt Antikörperbildung oder sonstige spezifische Antwort."

Für das "Immuncistron" fordert man eine hohe Mutabilität. Das "Immuncistron" wird im Thymus aktiviert. Die enorme Produktion an Lymphozyten im embryonalen und neonatalen Thymus (10^{10} Lymphozyten/Tag) und die hohe Mutabilität des "Immuncistrons" gewährleisten einen ausreichenden Informationsvorrat, der im Bedarfsfall abgerufen werden kann. Diese Immunmuster sind in ihrer Entstehung unabhängig von Antigenen.

BURNET (1973) charakterisiert den kleinen Lymphozyten wie folgt:

"Der kleine Lymphozyt ist ein bewegliches Vorratslager genetischer Information. Er besitzt nur diejenigen Funktionen des Zytoplasmas, die er für seine freie Beweglichkeit durch das Gewebe benötigt, hinzu kommen Rezeptoren für die Vermittlung von Umweltreizen zwecks Mobilisation besonderer Informationsgehalte."

Der wichtigste Unterschied zwischen B- und T-Lymphozyten liegt in ihrer unterschiedlichen Funktion bei der Immunantwort.

Werden B-Lymphozyten durch Antigen aktiviert, teilen sie sich und bilden Plasmazellen aus. Die Plasmazellen segregieren große Mengen an Antikörpern: pro Sekunde 2000 identische Antikörpermoleküle. Die Proliferation führt zur Entstehung eines Zellklons und somit zur Entstehung gleichartiger Zellen, die alle identische Antikörper bilden. Allerdings produzieren nicht alle Zellen eines solchen Zellklons Antikörper; ein Teil der Zellen geht wieder in den Ruhezustand über. Diese Zellen werden "Gedächtniszellen" genannt, weil sie jederzeit wieder in der Lage sind, auf das Antigen zu reagieren (JERNE, 1975; WACKER, 1974).

Werden T-Lymphozyten aktiviert, teilen sie sich und differenzieren sich zu Lymphoblasten. Die Lymphoblasten produzieren nicht-antigen-spezifische Faktoren ("Lymphokine"), wie die Bewegung der Makrophagen hemmende Faktoren (migration inhibition factors = MIF) (DAVID et al., 1964; BLOOM und BENETT, 1966), chemotaktische Faktoren (RAFF, 1973), zytotoxische (EVANS et al., 1972) und mitogene Faktoren (DUMONDE et al., 1969; MAINI et al., 1969; NILSSON, 1972; GORCZYNSKI et al., 1973; TAUSSIG, 1974; FARRAR, 1975; PLATE, 1976).

Diese Einteilung in T- und B-Zell-Funktionen ist jedoch nicht ganz

absolut: es gibt Hinweise darauf, daß auch B-Lymphozyten MIF, chemotaktische und mitogene Faktoren produzieren können (MACKLER et al., 1974).

T-Lymphozyten vermögen fremde Zellen abzutöten (Killerzellen). T-Zellen können aber auch die Reaktion von B- und anderen T-Lymphozyten unterdrücken (GERSHON et al., 1972) oder den B-Lymphozyten bei der Aktivierung durch ein Antigen "helfen".

Die T-Lymphozyten benötigen bei allen Reaktionen die Hilfe von Makrophagen (DUTTON et al., 1970; RAFF, 1973). Man bezeichnet die mononukleären phagozytierenden Zellen des Blutes und des Gewebes als Monozyten oder Makrophagen. Sie stammen möglicherweise von den gleichen Stammzellen ab, die die Thymusrinde besiedeln. Makrophagen unterscheiden sich von Lymphozyten durch ihre Eigenschaft zu phagozytieren und ihre Fähigkeit, an Glas anzuhaften. Die Rolle der Makrophagen bei der Antikörperproduktion ist noch ungeklärt.

Es wurden vier Hypothesen aufgestellt, um die Kooperation zwischen T- und B-Lymphozyten bei der Immunantwort zu erklären (vergl. ANDERSSON et al., 1972f):

1. Die "Faktor"-Hypothese von DUTTON:

Sowohl T- als auch B-Lymphozyten binden das Antigen. Die T-Zellen werden dadurch aktiviert und synthetisieren einen nichtspezifischen Faktor, der die B-Lymphozyten befähigt, auf das Antigen mit Zellteilung und spezifischer Antikörperproduktion zu reagieren.

2. Die "Cross-linking"-Hypothese von BRETSCHER und COHN:

Das Antigen besteht aus einem nichteiweißartigen Teil, dem Hapten, und dem Eiweißanteil, dem Trägerprotein. Die B-Lymphozyten binden Antigen über die Hapten-Determinante. Diese Reaktion reicht jedoch nicht aus, um die B-Zellen zur Antikörperproduktion anzuregen. Mit dem B-Zell-gebundenen Antigen reagieren auch T-Lymphozyten, aber über eine andere Determinante des Antigens: mit Rezeptoren für das Trägerprotein des Antigens. Dadurch entsteht eine Antigenbrücke zwischen T- und B-Lymphozyten.

3. Die "Lokale-Konzentrations"-Hypothese von MITCHISON:

Die T-Lymphozyten haben eine passive Rolle: Sie fangen mit ihren Immunglobulinrezeptoren, die gegen das Trägerprotein gerichtet sind, die Antigene auf. Mit der Hapten-Determinanten bieten sie dann das Antigen dem entsprechenden Rezeptor auf den B-Lymphozyten an. Damit vergrößern sie die den B-Lymphozyten angebotene effektive Antigenkonzentration und stabilisieren die Bindung zwischen Antigen und B-Zell-Rezeptor.

4. DUTTON stellte noch eine andere Hypothese zur T-B-Zell-Kooperation auf:

Durch gemeinsame Bindung des Antigens entsteht zwischen T- und B-Zellen ein sehr enger Kontakt. Dieser erlaubt auf nichtimmunologischem Wege eine Wechselwirkung zwischen den Membranen der beiden Zelltypen, die das aktivierende Signal darstellen könnte.

Es gilt heute als sicher, daß die Kooperation gewöhnlich über eine "Antigen-Brücke" zwischen T- und B-Zellrezeptoren zustande kommt. Unklar bleibt, ob diese Brücke zwischen B- und T-Zellen allein oder zwischen T-Zell-Rezeptoren, die von der Oberfläche von Makrophagen stammen, und B-Zellen besteht. Durch die "Antigen-Brücke" werden die B-Lymphozyten in die Nähe der T-Lymphozyten oder auch der Makrophagen gebracht, so daß über kurze Entfernungen wirkende Faktoren zwischen ihnen wirksam werden können.

Es gibt Hinweise darauf, daß in in vitro Versuchen antigenspezifische IgM-ähnliche Faktoren, die mit dem Antigen komplexiert sind, von den T-Lymphozyten ausgeschieden werden. Diese Faktoren neigen das Antigen, das eine geringe Bindungsfähigkeit für Zelloberflächen besitzt, an Makrophagen an (FELDMANN et al., 1973; RAFF, 1973). Radioaktive Antigene konnten monatelang auf der Oberfläche von Makrophagen nachgewiesen werden (WACKER, 1974). MARCHALONIS und CONE (1973) zeigten, daß isolierte Immunglobuline der T-Lymphozyten auf der Oberfläche von Makrophagen gebunden werden. Und HUDSON et al. (1974) wiesen bei Mäusen Ig-Moleküle auf aktivierten T-Lymphozyten nach, die von B-Zellen stammten.

Die Immunglobulinrezeptoren auf der Oberfläche der B-Lymphozyten sind normalerweise über die ganze Zelloberfläche verteilt. Nach Reaktion mit Antigenen sammeln sie sich als "Kappe" an einem Zellpol über der Golgi-Region an (TAYLOR et al., 1971; ANDERSSON et al., 1972f; SONI et al., 1975; RAFF, 1976).

Auf die "Kappenbildung" der Immunglobuline folgt sofort Pinozytose der Immunglobulinrezeptoren mit dem gebundenen Antigen. Dieser Vorgang wurde mit fluoreszenzmarkierten Antiimmunglobulinen beobachtet. Bereits 5 Minuten nach der Kappenbildung war jede Markierung von der Oberfläche verschwunden und wurde in der Zelle in der Nähe des Golgi-Apparates gefunden (TAYLOR et al., 1971).

Die "Kappenbildung" der Immunglobuline ist ein aktiver, temperaturabhängiger Prozess, der möglicherweise über kontraktile Mikrofilamente abläuft. Er wird durch Vernetzung der Oberflächenimmunglobulinmoleküle miteinander eingeleitet. Die Vernetzungen erfolgen

zwischen multivalenten Antigenen mit 2 oder mehreren identischen Antigen determinanten (RAFF, 1976).

Auf den T-Lymphozyten tritt nach Behandlung mit Anti-Theta ebenfalls "Kappenbildung" auf, jedoch nur bei hohen Konzentrationen an Anti-Theta. Der Theta-Faktor auf T-Lymphozyten wurde 1969 von RAFF entdeckt.

Die Bildung des Antigen-Antikörper-Komplexes ist lediglich der erste Schritt in der Immunreaktion. Der Weg bis zur Antikörperproduktion verläuft über ein komplexes System mit Wechselwirkungen zwischen den unterschiedlichsten Zelltypen. Eine Reihe von anderen morphologischen Zellarten als den hier dargestellten scheinen mit Antikörpern beladen zu sein. Experimente mit Antiseren gegen unterschiedliche Immunglobuline zur Entdeckung der Zelltypen, die die betreffenden Antikörper besitzen oder produzieren, erbrachten immer die stärkste Reaktion mit Plasmazellen. Aber es reagierten auch Keimzentren (Reaktionszentren in den primären Lymphfollikeln der Lymphknoten und der Milz) und verstreute Retikulumzellen, sowie einige kleine Lymphozyten aus der Flüssigkeit des Ductus thoracicus. Antigen wird auch von Zellen gebunden, die keine Antikörper produzieren; dazu gehören die Makrophagen. Und es werden Antikörper von Plasmazellen gebildet, in denen kein Antigen nachweisbar ist (BURNET, 1973).

Neben den Antigenen, die bei der Immunreaktion die Stimulation der kleinen Lymphozyten bewirken, sind eine Reihe unspezifischer Stimulanzien bekannt, die in vitro kleine Lymphozyten zu proliferierenden Zellen transformieren. Als nichtspezifisch bezeichnet man solche Substanzen, die mitogen wirken, ohne daß eine immunologische Sensibilisierung vorangegangen ist (COOPER, 1973).

Hierher gehören:

Phytohämagglutinin=PHA (NOWELL, 1960), Concanavalin A=Con A (KAMIN et al., 1969; POWELL und LEON, 1970), Pokeweed Mitogen=PWM (FARNES et al., 1964), Viren (SMITH et al., 1972), Tuberculin purified protein derivative =PPD (COWLING et al., 1963; NILSSON, 1973), bakterielle Mitogene wie Lipopolysaccharid=LPS (ANDERSSON et al., 1972e), Bakterienlysate (LING und HUSBAND, 1964; NAGEL et al., 1974), Protein A von Staphylococcus aureus (FORSGREN et al., 1976), Pneumokokken Polysaccharid S III (COUTINHO und MÖLLER, 1973), Antibiotika (HOVI et al., 1976).

Zink- (KIRCHNER und RÜHL, 1970), Lithium- (HUOT et al., 1972), Nickel- (HUTCHINSON et al., 1972) und Quecksilbersalze (SCHÖPF et al., 1969), Periodate (NOVOGRODSKY und KATCHALSKI, 1972; PARKER et al., 1973; DIXON et al., 1975; MONAHAN und ABELL, 1975) und zyklisches GMP (WEINSTEIN et al., 1974; DIAMANTSTEIN und ULMER, 1975).

Phytohämagglutinin (PHA) ist das bekannteste und das am häufigsten in Leukozytenkulturen verwendete Mitogen. Die stimulierende Wirkung dieses Mucoproteids (kohlenhydrathaltiges Protein mit zwei Disulfidbrücken) auf menschliche Lymphozyten entdeckte NOWELL (1960). Man verwendete Phytohämagglutinin zunächst seiner Fähigkeit wegen, Erythrozyten zu agglutinieren (LI und OSGOOD, 1949).

PHA wird als Salzextrakt aus *Phaseolus vulgaris* oder *Phaseolus communis* (rote Nierenbohne) gewonnen. Sein Molekulargewicht ist 128.000. Die meisten PHA-Präparationen enthalten zwei Molekültypen, die miteinander verbunden sind und verschiedene Membranspezifität zu haben scheinen (HENKART und FISHER, 1975). Die Bindungsorte des PHA scheinen Oligosaccharide einzuschließen (KORNFELD und KORNFELD, 1970).

Die beiden Untereinheiten des PHA werden als L-PHA (low-titer hemagglutinin mitogen) und H-PHA (high-titer hemagglutinin mitogen) bezeichnet. Beide Untereinheiten wirken mitogen auf menschliche Lymphozyten (YACHNIN et al., 1972).

Pokeweed Mitogen (PWM) wird als Kochsalzextrakt aus Beeren, Samen, Mark- und Stammgewebe, sowie aus Blättern und Wurzeln von *Phytolacca americana* (Pokeweed, Kermesbeere, Scharlachbeere) gewonnen. Die mitogene Wirkung dieser Substanz auf menschliche Lymphozyten in vitro wurde von FARNES et al. (1964) entdeckt. In vivo Stimulierung von Lymphozyten wurde von BARKER et al. (1966) bei Menschen nachgewiesen, die Kermesbeeren gegessen hatten oder mit dem Fruchtsaft der Pflanze in Berührung gekommen waren.

PWM besitzt drei biologische Aktivitäten: es agglutiniert Leukozyten und Erythrozyten und wirkt mitogen auf Lymphozyten (BÖRJESON et al., 1966).

Der Kochsalzextrakt von *Phytolacca americana* wurde später noch weiter gereinigt, bis man ein homogenes PWM-Präparat erhielt (BRITTINGER und KÖNIG, 1969). Das mittlere Molekulargewicht beträgt 32.000. Das Präparat besteht zu 1,4% aus Hexosamin und zu 3,26% aus Monosacchariden. Es enthält 19 mol% Cystein und 35 Disulfidbrücken (BRITTINGER und KÖNIG, 1969; DOUGLAS, 1972).

WAXDAL und BASHAM (1974) isolierten fünf mitogene Proteine aus *Phytolacca americana*, die sie als Pa-1 bis Pa-5 bezeichneten. Diese Proteine treten zu verschiedenen Jahreszeiten in der Pflanze auf und unterscheiden sich in ihren biologischen Aktivitäten (WAXDAL, 1974). Pa-2, Pa-3, Pa-4 und Pa-5 ähneln sich in der Aminosäurezusammensetzung, besitzen viele Disulfidbrücken und scheinen Monomere zu sein. Pa-1 unterscheidet sich von den anderen Proteinen in der Aminosäurezusammensetzung und hat wenig Disulfidbrücken. Es verhält sich bei der Gelfiltration wie ein Polymer. Sein Molekulargewicht ist 22.000 (WAXDAL und BASHAM, 1974).

PWM wirkt über eine große Konzentrationsspanne mitogen: für Pa-2 wurde ein Wirkungsbereich zwischen 0,5 µg/ml bis 500 µg/ml nachgewiesen (WAXDAL, 1974).

Die antigene Spezifität von PWM ist unbekannt.

Concanavalin A (Con A) ist ein Protein aus der Schwertpflanze *Canavalia ensiformis* (Jack bean = Jackbaumfrucht) (WEBER et al., 1974). Es hat ein Molekulargewicht von 71.000. Con A ist ein Protein aus 236 Aminosäuren, Mn^{2+} , Ca^{2+} und Sacchariden (EDELMAN et al., 1972). Bei einem pH-Wert unter 6 besteht Con A aus Dimeren, bei pH-Werten über 7 vorwiegend aus Tetrameren. Die asymmetrischen Einheiten haben ein Molekulargewicht von 25.500. In jedem Protomer befinden sich Zucker-Bindungsstelle. Con A reagiert mit Zuckern, die D-Arabinopyranosid-Konfiguration am Carbon 3,4 und 6 haben (DOUGLAS, 1972; BARAT und AVRAMEAS, 1973).

Die stimulierende Wirkung von Con A auf kleine Lymphozyten wurde erstmals von KAMIN et al. (1969) beschrieben.

Fast alle Lymphozyten tragen Bindungsstellen für Con A (GREAVES et al., 1972). Maximal werden etwa $5 \cdot 10^6$ Moleküle Con A pro Zelle gebunden (BETEL und VAN DEN BERG, 1972).

Lipopolysaccharide (LPS) von gram-negativen Bakterien (*Salmonellen*, *Escherichia*, *Shigella*)- auch Endotoxine genannt (NOWOTNY, 1969)- sind hochpolymer und bestehen aus einem Polysaccharidanteil und einem kovalent gebundenen Lipid, dem Lipid A. Das Molekulargewicht von LPS ist 10^6 und höher.

LPS wurde als Mitogen für kleine Lymphozyten von ANDERSSON et al. (1972e) beschrieben. Lipid A stellt die mitogene und endotoxisch aktive Region des LPS dar (CHILLER et al., 1973; MELCHERS und ANDERSSON, 1973). Typisch endotoxische Reaktionen wie Fieber, Schock und Tod werden nach Injektion von Lipopolysaccharid in Säugetieren

hervorgerufen (NOWOTNY, 1969).

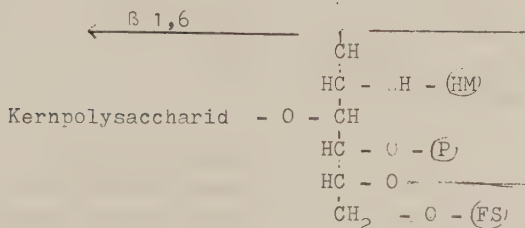
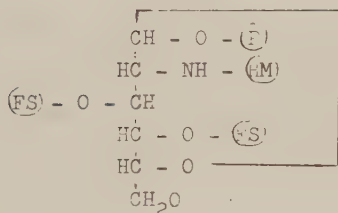
Lipid A wird von dem wasserlöslichen Lipopolysaccharidkomplex durch verdünnte Essigsäure, HCl oder durch Behandlung mit Ionenaustauschern abgespalten: es entstehen dabei die wasserunlöslichen Lipide und degradierte Polysaccharide (NOWOTNY, 1961).

Lipid A ist ein Phosphomucolipid und besteht aus einem Rückgrat aus 2 β -1,6-gebundenen D-Glukosamin-Disaccharid-Einheiten, die in Position 1 und 4' Phosphatreste und in Position 3' das Kernpolysaccharid tragen. Die anderen Hydroxyl- und Aminogruppen des Rückgrats sind mit langen Fettsäuren verestert, von denen hauptsächlich vorkommen: Laurinsäure, Myristinsäure, Palmitinsäure und 3-Hydroxymyristinsäure (RIETSCHEL et al., 1972; PARR et al., 1973). Die mitogene (MELCHERS und ANDERSSON, 1973) und die endotoxische (RIETSCHEL et al., 1972) Wirkung von Lipid A geht verloren, wenn die veresterten Fettsäuren durch alkalische Hydrolyse entfernt werden.

Strukturformel von Lipid A:

FS = langkettige Fettsäure

HM = β -Hydroxymyristinsäure



Der erste Schritt im Stimulationsprozeß der kleinen Lymphozyten durch nichtspezifische Antigene ist die Bindung des Mitogens an die Zellrezeptoren des Lymphozyten. Dieser Vorgang ist temperaturabhängig (INBAR et al., 1973) und erfordert die Anwesenheit divalenter Kationen im Medium (ALFORD, 1970; KAY, 1971; CHESTER, 1972; WHITNEY und SUTHERLAND, 1972; FREEDMAN und RAFF, 1975).

Es konnte gezeigt werden, daß sich Con A, PHA und LPS gleichermaßen an alle T- und B-Lymphozyten binden (GREAVES und JANOSSY, 1972; GREAVES et al., 1972). Jedoch schwankt die Anzahl der an der Zelloberfläche der Lymphozyten gebundenen Moleküle je nach dem verwendeten Mitogen (SKOOG et al., 1974). Con A bindet zweimal soviel Membranproteine wie PHA (HENKART und FISHER, 1975). Das Mitogen wird von multiplen Oberflächenmembranproteinen gebunden.

Bei optimaler Stimulationsdosis bindet LPS 2 bis 10% der gesamten verfügbaren Rezeptoren eines Lymphozyten. Das entspricht den Befunden mit Con A (ANDERSSON et al., 1972f).

Die Bindungsorte für Phytomitogene sind Kohlenhydratanteile von heterogenen Glycoproteinen. Con A bindet spezifisch α -D-Mannopyranol-, α -D-Glucopyranol- und sterisch verwandte terminale Zuckerreste. Dies entspricht auf der Zelloberfläche möglicherweise Polysacchariden, Glycolipiden und Glycoproteinen (BARAT und AVRAMEAS, 1973). Es konnte gezeigt werden, daß sich Con A mit dem Kohlenhydratanteil von IgM-Molekülen verbindet, aber auch mit anderen Glycoproteinen der Plasmamembran der Lymphozyten. Wahrscheinlich werden bei der Stimulation Bindungen mit verschiedenen Membrankomponenten eingegangen (MELCHERS und ANDERSSON, 1973). Con A, PHA und PWM scheinen verschiedene, aber sich überlappende Spektren von Saccharidspezifität zu haben (GERY et al., 1972a; GREAVES und JANOSSY, 1972; SKOOG et al., 1974; HENKART und FISHER, 1975; SHEPPARD et al., 1976).

Bindung der Mitogene an die Lymphozytenoberfläche ist zwar notwendig aber nicht ausreichend, um die Zellen zu aktivieren. Nach der Bindung des Mitogens kommt es zunächst zu Reaktionen in der Zellmembran. Die Oberflächenrezeptoren werden wie nach Antigenstimulierung zu "Kappen" an einem Zellpol angesammelt und sehr bald durch Pinozytose in die Zelle aufgenommen. "Kappenbildung" wurde für PHA, Con A und in geringem Maße für PWM nachgewiesen (TAYLOR et al., 1971; GREAVES und JANOSSY, 1972; BARAT und AVRAMEAS, 1972; MELCHERS und ANDERSSON, 1975).

Die Umverteilung der Con A-Rezeptoren auf der T-Zell-Membran führt zu einer Veränderung der elektrischen Ladung der Zelle. Folgende Modifikationen in den ionisierten Gruppen der T-Zell-Membran bewirken die Veränderung des Oberflächenpotentials (SATO und KOJIMA, 1976; WIGLIAND et al., 1976):

1. Nach Reaktion des Lectins mit der Zellmembran nimmt die Dichte der Aminogruppen ab. Dies deutet auf ein Verschwinden oder eine Umverteilung der Proteine in der Zellmembran hin (z.B. Pinozytose).
2. Die Dichte der Kohlenhydratgruppen der Salicylsäuren, einer Molekülart, die auf der Oberfläche von allen Säugerzellen vorkommt, verringert sich.
3. Es treten Modifikationen in der Dichte von Phosphatgruppen auf, die sensitiv für alkalische Phosphatase sind, und von undefinierten negativ beladenen Gruppen: es scheint nach der Umverteilung der Membranrezeptoren eine neue Struktur der Membran vorzuliegen.

Die Membranveränderungen führen zu einer verringerten Membranviskosität (INBAR und SHINITZKY, 1975). Die Permeabilität für Zucker, Aminosäuren, Nukleoside und Ionen nimmt zu (FERBER und RESCH, 1976). Die intrazelluläre Konzentration an zyklischem GMP (Guanosinmonophosphat) (BARNETT et al., 1974) und an zyklischem AMP (Adenosinmonophosphat) steigt an, und als Folge davon kommt es zu einer Hemmung der Ca-Ionen-Aufnahme (vgl. WHITNEY und SUTHERLAND, 1972). Veränderungen im Phospholipidmetabolismus der Zellmembran wurden vielfach beschrieben (RESCH et al., 1971; RESCH und FERBER, 1972; RESCH et al., 1972; RESCH et al., 1976).

Membrangebundene Enzyme werden aktiv: ATPasen = cyclische Nukleotide generierende Enzyme - und Phospholipid-metabolisierende Enzyme (FERBER und RESCH, 1973; FERBER und RESCH, 1976).

FERBER und RESCH (1976) nehmen an, daß Veränderungen der Fettsäureanteile der Phospholipide die "molekulare Basis für den Auslösemechanismus der Zellaktivierung" sind. Der Auslösemechanismus erfolgt in drei Phasen (FERBER und RESCH, 1976):

1. Membranen bestehen aus einem Mosaik aus quasikristallinen Phospholipidanteilen innerhalb flüssiger Phospholipide. Die Aggregation der mitogenen Rezeptoren nach Bindung eines Liganden an die Membranrezeptoren führt zur Phasentrennung der Phospholipide. Dadurch wird die Membran fluider und membran-assoziierte Enzyme werden aktiv.
2. Die Enzyme setzen die Fettsäureketten der Phospholipide zu Lyso-phosphatiden und freien langkettigen Fettsäuren um. Die Zwischen-

produkte dieses Stoffwechselzyklus sind sehr oberflächenaktiv. Durch die Entfernung von Fettsäureketten aus Phospholipiden wird die Packung der Fettsäureketten in der Phospholipidgrundstruktur aufgelockert. Das bedeutet: die Fluidität der gesamten Membran nimmt zu.

5. Andere Enzyme transferieren hochungesättigte Fettsäuren in Phospholipide. Der Ersatz von gesättigten Fettsäuren durch ungesättigte führt ebenfalls zu einer fluideren Membran.

Durch die qualitativen Veränderungen der Phospholipidfettsäuren wird eine "neue" Membran mit veränderten Eigenschaften geschaffen.

Nach Bindung von Con A an Lymphozyten wurde Pinozytose beobachtet (TAYLOR et al., 1971). Markiertes PHA wurde im Plasma der Lymphozyten und manchmal auch im Kern nachgewiesen (GREAVES und JANOSSY, 1972). Dies deutet daraufhin, daß der eigentliche Wirkungsort des Mitogens möglicherweise der Kern ist.

Die PHA-induzierte Transformation der Lymphozyten wird verhindert, wenn die "Kappenbildung" und die Pinozytose durch Cytochalasin B gehemmt werden (TAYLOR et al., 1971).

Intranukleäre Veränderungen können sehr bald nach der Mitogenzugabe nachgewiesen werden: Es wurden Veränderungen in der Fraktion der Nicht-Histon-roteine des Chromatins beobachtet (JOHNSON et al., 1974; HEMMINKI, 1975; YEOMAN et al., 1976). Azetylierung von Histonen und Freilegung von Phosphatgruppen in Kernproteinen werden beschrieben (KILLANDER und RIGLER, 1965; KILLANDER und RIGLER, 1969; RIGLER und KILLANDER, 1969). Diese Vorgänge lassen eine direkte Gen-derepression vermuten (GREAVES und JANOSSY, 1972).

Die morphologischen und biochemischen Vorgänge während der Transformation wurden oft beschrieben (für PHA: COOPER et al., 1962; MAC KINNEY et al., 1962; ROBBINS, 1964; SALZMAN et al., 1966; STEFFEN und SÖREN, 1968; SKOOG, 1972; DOUGLAS, 1972; JANOSSY et al., 1973; für PWM: CHESSIN et al., 1966; BARKER und FARNES, 1967; DOUGLAS et al., 1967; DOUGLAS und FUDENBERG, 1969; BIBERFELD und MELLSTEDT, 1974). DOUGLAS (1972) faßt die Ergebnisse wie folgt zusammen:

Bei lichtmikroskopischen Studien stellt man eine Größenzunahme der Zellen, zunehmende Basophilie des Zytoplasmas und Zunahme der Vakuolenzahl fest.

Zytochemische Untersuchungen zeigten eine Zunahme in der Zahl der Lysosomen und ein vermehrtes Auftreten von Lipidvakuolen. Dagegen nimmt in transformierten Lymphozyten die Glykogenmenge ab.

Bereits 15-30 Minuten nach Zugabe von PHA oder anderen Mitogenen wird Leukoagglutination beobachtet (HÜLSER und PETERS, 1972; PETERS, 1972; FIBACH, 1976). PETERS (1972) postuliert, daß Zellkontakt eine notwendige Voraussetzung für die Lymphozytenstimulierung durch PHA und PWM ist. HÜLSER und PETERS (1972) konnten einen Ionenfluß zwischen PHA-stimulierten Lymphozyten mit Zellkontakt mit Hilfe von Mikroelektroden messen. Die Autoren schließen auf einen Austausch von Information zwischen den Zellen bei Kontaktaufnahme.

Etwa vier Stunden nach PHA-Zugabe treten morphologische Veränderungen im Nukleolus der stimulierten Lymphozyten auf. Der Nukleolus vergrößert sich und ändert seine Gestalt (GANI, 1976). Diese Vorgänge sind möglicherweise mit der rRNS-Synthese korreliert.

Intensive RNS-Synthese beginnt bereits wenige Minuten nach PHA-Zugabe (EPSTEIN und STOHLMAN, 1964; COOPER und RUBIN, 1965; SALZMAN et al., 1966; COOPER, 1969; HAUSEN et al., 1969).

Die Proteinsynthese beginnt drei Stunden nach PHA-Zugabe und steigt linear an (HIRSCHHORN et al., 1963; SHAPIRO und LEVINA, 1966; LOEB et al., 1970; AHERN und KAY, 1975). Nach Stimulierung mit LPS wurde erst nach 10-15 Stunden ein Anstieg der Proteinsynthese gefunden. Die Proteinsynthese war hier mit einer steigenden Rate an intrazellulärem IgM korreliert (MELCHERS und ANDERSSON, 1973).

Etwa 20 Stunden nach Zugabe von PHA beginnt die DNS-Synthese (KAY, 1970; LOEB et al., 1970). Gleichzeitig wird das Kernchromatin zunehmend dispers. Die DNS-Synthese und die anschließende Mitoseaktivität in der Lymphozytenkultur - vor allem nach Stimulierung mit PHA - sind oft untersucht worden (für PHA: LIMA-DE-FARIA et al., 1961; BENDER und PRESCOTT, 1962; MICHALOWSKI, 1963; BIANCHI und De BIANCHI, 1965; SALZMAN et al., 1966; SCHELLEKENS und EIJSSVOOGEL, 1968; KAY, 1970; LOEB et al., 1970; STEWART et al., 1975; für PWM: CHESIN et al., 1966).

Zwischen 48 und 60 Stunden nach PHA-Zugabe vergrößern sich die ribosomalen Aggregate in den stimulierten Lymphozyten. Das rauhe Endoplasmatische Retikulum und der Golgikomplex vergrößern sich ebenfalls. Die Mitochondrienzahl steigt an (DOUGLAS, 1972).

Nach Stimulierung mit PWM zeigen etwa 20-30% der transformierten Lymphozyten eine geringere Größenzunahme als Lymphozyten in PHA- und Con A-stimulierten Kulturen, einen heterochromatischen Kern, ein intensiv entwickeltes rauhes Endoplasmatisches Retikulum und einen gut entwickelten Golgi-Apparat (DOUGLAS et al., 1967; DOUGLAS, 1972).

Viele Zellen haben nach 7-10 Tagen in der Kultur das Aussehen von Plasmazellen (JANOSSY et al., 1973; SHOHAT et al., 1973).

Die erfolgreiche Stimulierung der Lymphozyten zu proliferierenden Zellen ist abhängig von der Anwesenheit des Mitogens über einen bestimmten Zeitraum, der je nach dem verwendeten Stimulans variiert (für PHA: KAY, 1970; POWELL und LEON, 1970; WEBER et al., 1974; Für PWM: BRITTINGER und KÖNIG, 1969; SKOOG et al., 1974; YOUNKIN, 1975).

PHA- und PWM-stimulierte Lymphozyten benötigen nur einen kurzen Kontakt mit dem Mitogen, um zu proliferierenden Zellen zu werden: mit PHA bis zu 6 Stunden (KAY, 1970) und mit PWM ca. 30 Minuten (BRITTINGER und KÖNIG, 1969). Anders reagieren die Lymphozyten auf Con-A-Stimulierung (POWELL und LEON, 1970; NOVOGRODSKY und KATCHALSKI, 1971; WEBER et al., 1974). WEBER et al. (1974) teilen die Transformation der Lymphozyten nach Con A-Kontakt in 4 Phasen ein:

1. Bindung der stimulierenden Moleküle an die Zellmembran.
2. Reaktion des Mitogens mit einem aktivierenden System; die G_1 -Phase ist erreicht; die Zellen sind präaktiviert.
3. Der präaktivierte Zustand der Zellen ist reversibel und kann, wenn kein Kontakt mit dem Mitogen mehr besteht, über 60 Stunden anhalten. Danach gehen diese Zellen wieder in die G_0 -Phase (den Ruhezustand) über.
4. Besteht dagegen noch Kontakt mit dem Mitogen, beginnen die Zellen mit der DNS-Synthese und teilen sich mitotisch. Nach Beginn der DNS-Synthese sind alle weiteren Schritte mitogen-unabhängig und irreversibel.

Die zweite Zellzyklusrunde nach Con A-Stimulierung ist jedoch wieder mitogen-abhängig (PAULI und STRAUSS, 1973).

Nach Mitogenzugabe werden niemals alle kleinen Lymphozyten in der Kultur aktiviert: auf PHA reagieren 80-90% der Zellen, auf PWM 40-60% der Zellen (DOUGLAS, 1972). Dieser Anteil an reagierenden Zellen ist beträchtlich höher als man nach einer "klassischen Immunantwort" erwarten würde, bei der das Antigen nur von wenigen Zellen (etwa 0,02%) erkannt wird. Das zeigt, daß die Reaktion auf Mitogene unspezifisch ist; es handelt sich um eine polyklonale Lymphozytenantwort.

T- und B-Lymphozyten-Populationen sind in sich heterogen. T-Zell-Subpopulationen wurden von BACH und DARDENNE (1973), OLSSON und CLAESSEN (1973), KISIELOW et al. (1975) und JANEWAY et al. (1975) und SASAKI et al. (1975) beschrieben. Über B-Zell-Subpopulationen

berichten GREAVES und BROWN (1973), DIAMANTSTEIN et al. (1974), SIEGEL et al. (1974) und MAYER et al. (1976). Es ist anzunehmen, daß die Subpopulationen verschieden auf die Mitogene reagieren.

PHA und Con A sind T-Zell-Mitogene (JANOSSY und GREAVES, 1972; DOENHOFF et al., 1974; GEHA et al., 1974); PWM stimuliert T- und B-Lymphozyten (JANOSSY und GREAVES, 1971; ANDERSSON et al., 1972f; GREAVES und JANOSSY, 1972; JANOSSY und GREAVES, 1972; PARKHOUSE et al., 1972; BIBERFELD und MELLSTEDT, 1974; DOENHOFF et al., 1974; GREAVES et al., 1974; STEVENS et al., 1975) und LPS eine Subpopulation von B-Lymphozyten (IVANYI und LEHNER, 1974; ASKONAS et al., 1976). Es ist noch unklar, warum Mitogene entweder T- oder B-Lymphozyten aktivieren, obwohl sie gleich gut an beide Zelltypen binden (GREAVES et al., 1972).

Lokal konzentriertes Con A (ANDERSSON et al., 1972a; GREAVES und BAUMINGER, 1972) und PHA an Sepharosewolle gebunden (MELVYN et al., 1972) vermögen B-Lymphozyten zu aktivieren. ANDERSSON et al. (1972f) erklären diesen Befund damit, daß nicht nur die "Saccharid-Rezeptoren" für PHA und Con A auf den Lymphozyten für diesen Stimulierungsvorgang verantwortlich sind, sondern daß dazu ein zweiter Rezeptortyp mit dem Lectin-Rezeptor-Komplex in Wechselwirkung stehen muß. Nur wenn eine ausreichende Anzahl an Rezeptoren des zweiten Typs mit dem Lectin-Rezeptor-Komplex in Wechselwirkung stehen, wird die Zelle aktiviert. Die B-Lymphozyten hätten demnach weniger Rezeptoren des zweiten Typs als die T-Lymphozyten.

Im Hinblick auf die Stimulation von B-Lymphozyten durch LPS nehmen ANDERSSON et al. (1972f) an, daß dieses große Molekül in der Lage ist, Rezeptoren des zweiten Typs durch multiple Bindung auf der Zelloberfläche zu konzentrieren. Alternativ besteht die Möglichkeit, daß LPS auf einen Rezeptor des zweiten Typs mit einer anderen Charakteristik als der, die bei Con A-Stimulierung postuliert wird, wirkt. LPS kann möglicherweise an B-Zell-Rezeptoren binden, die keine Immunglobuline sind (nichtspezifisch) und gleichzeitig auch an Ig-Rezeptoren mit antigenen Determinanten gegen Lipopolysaccharid (immunologisch). Ähnlich deuten auch WATSON et al. (1973) und GALANAUD et al. (1976) ihre Ergebnisse.

B-Zell-Mitogene sind vor allem Antigene mit sich wiederholenden Determinanten. Solche Proteine haben ein langsames Turnover, da solche Polymere nur schwer in ihre Untereinheiten zerlegt werden können (GREAVES et al., 1972).

Mitogen stimulierte B-Lymphozyten ähneln Plasmazellen (SHOHAT et al., 1973; MELCHERS und ANDERSSON, 1973; PHILLIPS und ROITT, 1973) und segregieren IgM (PARKHOUSE et al., 1972; PIGUET und VASSALLI, 1972). Nach LPS-Stimulation entsteht eine große Anzahl von kleinen Lymphozyten mit einer hohen Dichte an Oberflächen-Ig aber ohne verinnerlichte Immunglobuline und eine kleine Zellpopulation mit einem großen intrazellulären Ig-Pool und der Fähigkeit, Ig zu segregieren. Beide Zelltypen stammen von den sich teilenden Blastenzellen ab (ASKONAS et al., 1976).

In PHA- und Con A-Kulturen werden auch B-Lymphozyten stimuliert. Dies konnten PHILLIPS und ROITT (1973) und VISCHER (1972) mit der Immunfluoreszenzmethode mit Antikörpern gegen Immunglobuline nachweisen. B-Zell-Aktivierung tritt jedoch nur bei Anwesenheit von T-Lymphozyten auf, was bedeutet, daß die B-Lymphozyten die Hilfe der T-Lymphozyten bei der Aktivierung benötigen (ANDERSSON et al., 1972f). Außerdem erfordert die B-Zell-Stimulierung durch ein T-Zell-Mitogen die Anwesenheit von Makrophagen (LEVIS und ROBBINS, 1970; GOLDMAN und RAZ, 1975; HEDFORS et al., 1975).

In Versuchen mit dem Überstand von 24-Stunden-Kulturen Con A-stimulierter T-Lymphozyten konnten ANDERSSON et al. (1972b) zeigen, daß die B-Zellen durch diesen Überstand befähigt werden, auf das anwesende T-Zell-Mitogen zu reagieren. Dies wurde von NILSSON (1972) auch für den Überstand aus PHA-Kulturen bestätigt. Es sind also weder Makrophagen, noch T-Lymphozyten absolut wichtig beim Stimulationsprozeß, da ihre Funktion durch nichtspezifische Stimulanzien (hier: Lymphokine) ersetzt werden kann (DIAMANTSTEIN und BLITSTEIN-WILLINGER, 1974).

Es ist bekannt, daß nach Mitogenstimulierung Lymphokine produziert werden: mitogene Faktoren = LAF (lymphocyte activating factor) (MAINI et al., 1969; ANDERSSON et al., 1972f; GERY et al., 1972; MACKLER et al., 1972; SMITH und BARKER, 1972; VISCHER, 1972; CERNY, 1974; SERAVALLI, 1976; WALDMANN et al., 1976), migrationshemmende Faktoren = MIF (migration inhibition factor) (PICK et al., 1970; LAMELIN und VASSALLI, 1971), chemotaktische Faktoren = SRF (skin reactive factor) (PICK et al., 1970; SCHWARTZ et al., 1970) und cytotoxische Faktoren (GINSBURG, 1971).

Unter Mitogeneinfluß segregieren die Makrophagen B-Zell-aktivierende Faktoren (WOOD und CAMERON, 1976).

In Gegenwart von T-Zell-Mitogenen müssen zuerst die "Helferzellen" ihre Wirkung entfalten, bevor die B-Zellen stimuliert werden können

(ANDERSSON et al., 1972f).

Die Ergebnisse der ultrastrukturellen (BIBERFELD, 1971; PARKHOUSE et al., 1972; GORMLEY und ROSS, 1972; JANOSSY et al., 1973), biosynthetischen und funktionellen Studien (CHESSIN et al., 1966; DOUGLAS und FUDENBERG, 1969; JANOSSY et al., 1976) an aktivierten T- und B-Lymphozyten lassen vermuten, daß die Reaktion dieser Zellen auf nicht-spezifische Antigene in vitro primär ihre spezifischen Fähigkeiten reflektiert, d.h. die Fähigkeiten der Mitogen-aktivierten T- und B-Lymphozyten scheinen identisch mit denen der Antigen-aktivierten T- und B-Lymphozyten zu sein (ANDERSSON und BLOMGREN, 1971; ANDERSSON et al., 1972f; GREAVES und JANOSSY, 1972; STEVENS et al., 1975; ASKONAS et al., 1976).

Es scheint daher gerechtfertigt, mitogene Stimulierung von Lymphozyten mit Lymphozytenaktivierung durch spezifische Antigene gleichzusetzen (RAFF, 1973).

untersuchungen an Leukozytenkulturen mit Phytohemagglutinin (PHA) deuten darauf hin, daß die stimulierten Lymphozyten keine einheitliche, synchrone Population in der Kultur darstellen.

Bei Untersuchungen zur Strahlen- und Chemomutagenese ist es von Bedeutung, erste in vitro Mitosen zu erfassen, um Kultureinflüsse auf die Aberrationsrate und eine Selektion der Zellen in der Kultur aufgrund ihrer Schädigung weitgehend auszuschalten. BENDER und PRESCOTT (1962) wiesen nach, daß bereits nach 36 Stunden Kulturdauer Mitosen auftreten. Nach Markierung mit radioaktivem Thymidin über 30 Minuten nach 48 Stunden Kulturdauer konnten sie nachweisen, daß noch nach 156 Stunden Kulturdauer erste Mitosen auftraten, während die meisten ersten Mitosen nach 72 Stunden Kulturdauer gefunden wurden. Die Zellen benötigen also von der S-Phase bis zur Mitose zwischen 24 und 108 Stunden.

Der höchste Prozentsatz an Mitosen tritt unter normalen Kulturbedingungen 72 Stunden nach Kulturbeginn auf. BUCKTON und PIKE (1964) haben jedoch gezeigt, daß nach 72 Stunden Kulturdauer bereits die zweite Zellteilung in vitro erfolgt. Durch Markierung mit ^3H -Thymidin zu unterschiedlichen Zeiten nach Kulturbeginn und Auswertung der Markierung über den Metaphasechromosomen konnten ASAKI und NORMAN (1966) bestätigen, daß 70-80% der Zellen nach 72 Stunden bereits die

zweite Zellteilung durchlaufen. BENDER und BREWEN (1969) zeigten, daß in Kulturen, deren Zellen bei Kulturbeginn bestrahlt wurden, nach 60 Stunden dizentrische Chromosomen ohne Fragmente auftraten. Diese Zellen müssen bereits die zweite Zellteilung nach Bestrahlung durchlaufen.

MICHALOWSKI (1963) fand nach ^{14}C -Thymidinmarkierung in der PHA-stimulierten Leukozytenkultur einen biphasischen Verlauf der DNS-Synthese, sowie zwei Maxima der Mitoseindices bei 65 und 77 Stunden Kulturdauer. STEFFEN und STOLZMANN (1969) sammelten mit Hilfe eines Syntheseblocks über 70 Stunden alle transformierten Zellen an der G_1/S -Grenze des Zellzyklus an. Nach Entfernung des Blocks traten im Abstand von 6 Stunden 2 Mitosemaxima auf. Das erste Mitosemaximum erschien 15 Stunden nach Aufhebung des G_1/S -Blocks.

Ein biphasischer Verlauf der DNS-Synthesekurve nach ^3H -Thymidin-Einbau und Autoradiographie wurde auch in Versuchen unserer Arbeitsgruppe gefunden (DUDIN et al., 1974; SLADIK-ERBEN, 1976). MICHALOWSKI (1963) erklärte den biphasischen Verlauf der DNS-Synthesekurve mit dem Vorhandensein von zwei Zellpopulationen, die zu unterschiedlichen Zeiten mit ihrer DNS-Synthese beginnen. Zu diesem Schluß kamen auch andere Autoren (JOHANSEN, 1972; ZANK et al., 1972; SÖREN, 1973). Den Nachweis, daß beide Zellpopulationen nicht gleichzeitig ihre DNS-Synthese beginnen, erbrachten JAGINSKA et al. (1970), indem sie zu verschiedenen Zeiten die Raten der Zellen bestimmten, die sich am G_1/S -Block ansammelten. Von unserer Arbeitsgruppe wurde ein weiterer Beweis durch folgenden Versuch erbracht: Lymphozytenkulturen wurden zwischen 26 und 36 Stunden Kulturdauer mit ^3H -Thymidin markiert. Zwischen 38 und 54 Stunden Kulturdauer wurden die Mitosen mit Colcemid angesammelt. 50% der Mitosen waren nicht markiert. Das bedeutet, daß 50% der Zellen, die bis 54 Stunden Kulturdauer in Mitose gehen, ihre DNS-Synthese erst nach 36 Stunden Kulturdauer beginnen (DUDIN et al., 1974).

Die beiden Zellpopulationen in der PHA-stimulierten Leukozytenkultur beginnen auch zu unterschiedlichen Zeiten, ihre DNS-Synthese zu aktivieren. Der Verlauf der DNS-Synthesekurve wurde ebenfalls als biphasisch beschrieben (BEEK und OBE, 1975).

STEFFEN und STOLZMANN (1969) schreiben den beiden vermuteten Populationen einen unterschiedlichen Anteil an den in vitro Mitosen und eine unterschiedliche Länge der S-Phase zu.

Die Erforschung der beiden Zellpopulationen wurde von Bedeutung für die Strahlen- und Chemomutagenese nachdem BENDER und BREWEN (1969)

berichtet, daß es in Leukozytenkulturen zwei Zellpopulationen mit unterschiedlicher Strahlenempfindlichkeit gibt, die zeitlich zueinander versetzt ihren Zellzyklus durchlaufen. Sie fanden die empfindlichsten Zellen bei 54 Stunden Kulturdauer und weniger empfindliche bei 72 Stunden. Die geringste Strahlensensibilität war bei 66 Stunden Kulturdauer zu verzeichnen. In einer weiteren Arbeit berichten STEFFEN und MICHALOWSKY (1973), daß die von ihrer Arbeitsgruppe beschriebenen zwei Lymphozytenpopulationen (STEFFEN und STOLZMANN, 1969) sich in ihrer Strahlenempfindlichkeit unterscheiden. BYFIELD et al. (1974) fanden bei Untersuchungen an strahlentherapeutisch behandelten Patienten, daß die B-Lymphozyten etwas weniger strahlenempfindlich sind als die T-Lymphozyten. MELLO et al. (1974) berichten über T-Zell-Subpopulationen, die sich in ihrer Strahlenempfindlichkeit voneinander unterscheiden.

Die beiden Lymphozytenpopulationen, die in unserer Arbeitsgruppe beschrieben wurden (DUDIN et al., 1974), unterscheiden sich um einen Faktor 3 in ihrer Empfindlichkeit gegenüber alkylierenden Agenzien bezüglich der Induktion von Chromatidentranslokationen (BEEK und OBE, 1974). Und die erste Population ist strahlenempfindlicher als die zweite (BEEK und OBE, 1976).

Nach diesen Ergebnissen ist es notwendig, die Kulturbedingungen zu vereinheitlichen. Arbeiten dazu sind bis heute nur wenige veröffentlicht (z.B. MOORHEAD et al., 1967; SCHELLEKENS und EIJSVOOGEL, 1968; BOSMAN et al., 1975).

II. MATERIAL UND METHODEN

Die Experimente wurden nach einer Mikrokulturmethode durchgeführt. Es wurde peripheres Venenblut klinisch gesunder Personen verwendet.

1. Autoradiographische Analysen der DNS-Synthese:

Kulturansatz:

Für jeden Versuch wurden 8 Kulturen angesetzt, die folgendermaßen zusammengesetzt waren (%-Angaben in vol / vol):

80 - 85%	Medium (Ham's F 10, Biocult Laboratories Glasgow, Scotland, oder TC Medium 199)
10%	Fetal Bovine Serum (Microbiological Associates inc., Bethesda Maryland)
0,4%	Penicillin/Dihydrostreptomycinsulfat-Gemisch (= 2 mg Dihydrostreptomycin und 200 i.E. Penicillin in 10 ml Kulturgemisch)
4,0%	peripheres Venenblut (heparinisiert)

und die zur Stimulation der Lymphozyten erforderliche Menge eines Mitogens:

2,4%	Bacto-Phytohämagglutinin (Difco) (renhydriert mit 5 ml Ham's F 10 Medium)
3,1%	Concanavalin A (Calbiochem) (aufgelöst in Ham's F 10 Medium) = 12,5 µg / ml Kulturgemisch
2,4%	Pokeweed Mitogen (Grand Island Biological Company) (aufgelöst in 10 ml sterilem aqua dest.)
3,8%	Bacto-Lipopolysaccharid W (S.Typhosa; Difco) = 0,02 mg / ml Kulturgemisch

Die Mediummenge variierte je nach der Menge des zugegebenen Mitogens. Das Endvolumen der Kulturen richtete sich nach der Dauer des Versuchs.

Bei den Versuchen mit Concanavalin A, Pokeweed Mitogen, Lipopolysaccharid und Blei wurde Blut einer klinisch gesunden Frau verwendet, bei den Versuchen mit TC Medium 199 und Ham's F 10 + Phytohämagglutinin Blut eines klinisch gesunden Mannes.

Die 8 Kulturen eines Versuchs wurden zu vier verschiedenen Zeiten angesetzt. So konnte der für die Aufarbeitung benötigte Zeitaufwand

reduziert werden (vergleiche Zeitschemata). Zwischen den Zugabezeiten wurde das Blut im Kühlschrank aufbewahrt.

Es wurden je zwei Parallelkulturen angesetzt.

Die Kulturen wurden in leichter Schräglage im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

Radioaktive Markierung:

Jedem Kulturgefäß wurden nach kräftigem Schütteln 1 oder 2 ml Kulturflüssigkeit mit einer 4 ml Monovette (Nr. 750 von Sarstedt, Nümbrecht) entnommen.

30 Minuten (bei Lipopolysaccharid) oder 15 Minuten vor Aufarbeitung wurden diese Kulturen mit 1 $\mu\text{Ci} / \text{ml}$ (Methyl- H^3)-Thymidin (Radiochemical Centre Amersham, Buckinghamshire England) versetzt. Das Thymidin hatte die spezifische Aktivität von 2 Ci / mmol; im Versuch mit Concanavalin A von 41 Ci / mmol.

Die Kulturen wurden nach der Thymidinzugabe leicht geschüttelt und 30 bzw. 15 Minuten im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

Aufarbeitung:

Es wurde wie folgt verfahren:

- 10 Minuten zentrifugieren bei 800 UpM. Absaugen des Überstandes.
- Hypotoner Schock: Sediment mit 2 ml einer 0,075 M KCl-Lösung überschichten, gut durchpipettieren und 5 Minuten bei Zimmertemperatur stehenlassen.
- 10 Minuten zentrifugieren bei 800 UpM und den Überstand absaugen.
- Zellsediment mit 2 ml eines Fixiergemisches (Methanol/Eisessig 3 : 1) versetzen, schnell durchpipettieren, zentrifugieren und den Überstand absaugen. Diesen Arbeitsgang noch zweimal wiederholen.
- Zellsediment in wenigen Tropfen Fixativ resuspendieren und auf eisgekühlte Objektträger auftropfen.
- Lufttrocknen der Präparate

Pro Kultur wurde ein Präparat angefertigt.

Die für das Arbeiten mit radioaktiven Substanzen vorgeschriebenen Sicherheitsbestimmungen wurden beachtet. Die Aufarbeitung erfolgte in den Sarstedt-Einwegspritzen, die auch als Zentrifugenröhrchen geeignet sind. Sie wurden am Ende des Versuchs als radioaktiver Abfall verworfen.

Aufgearbeitet wurde im zwei-Stunden-Abstand nach folgenden Zeitplänen:

1. Tag Kultur- beginn	3. Tag Aufarbeitung	4. Tag Aufarbeitung	4. Tag
18 ⁰⁰	33 40 42 44 46 43 50	62 64 66 63 70	74 Stunden
19 ⁰⁰	37 39 41 43 45 47 49	61 63 65 67 69	77 Stunden
	8 ⁰⁰ —10 ⁰⁰ —12 ⁰⁰ —14 ⁰⁰ —16 ⁰⁰ —18 ⁰⁰ —20 ⁰⁰ 8 ⁰⁰ —10 ⁰⁰ —12 ⁰⁰ —14 ⁰⁰ —16 ⁰⁰ —18 ⁰⁰ —20 ⁰⁰		
8 ⁰⁰	24 26 28 30 32 34 36	52 54 56 58	60 Stunden
9 ⁰⁰	23 25 27 29 31 33 35	51 53 55 57	59 Stunden
2. Tag Kultur- beginn			

ZEITSCHHEMA für die Versuche: Phytohämagglutinin (mit Ham's F 10 Medium oder 10C Medium 199)

Pokeweed Mitogen

Lipopolysaccharid

Phytohämagglutinin + Ham's F 10 Medium mit 10^{-5} M Bleiacetat (Serien A, C und D)

1. Tag Kultur- beginn		3. Tag Anfärbung
7 ⁰⁰		38 40 42 44 46 48 50 Stunden
	9 ⁰⁰	9 ⁰⁰ 11 ⁰⁰ 13 ⁰⁰ 15 ⁰⁰ 17 ⁰⁰ 19 ⁰⁰ 21 ⁰⁰
	9 ⁰⁰	24 26 28 30 32 34 36 Stunden
	2. Tag Kultur- beginn	

ZEITSCHHEMA für den versuch: Phytohämagglutinin + Ham's F 10 Medium mit 10^{-5} M Bileacetat
(Serie B)

Färbung der Präparate:

Die Präparate wurden mit einer 2%igen Orceinlösung (65% Essigsäure, 2% Orcein) gefärbt. Die Färbedauer betrug etwa 30 - 45 Minuten. Nach der Färbung wurden die Präparate in Alkohol gesüßt und getrocknet.

Autoradiographie:

Das Beschichten der Präparate mit Filmemulsion erforderte folgende Arbeitsgänge, die alle in der Dunkelkammer bei schwachem Rotlicht (KODAK "WRATTEN" Safelight, Serie 1) erfolgten:

- Die orceingefärbten Präparate paarweise, mit den zellfreien Flächen aneinanderliegend, in Glasküvetten einordnen und im Wasserbad bei 45°C erwärmen.
- Emulsion (KODAK nuclear track emulsion, Typ NTB 3 oder ILFORD K5). aus der Vorratsflasche 1 : 1 mit aqua bidest verdünnen und 15 Minuten bei 45°C erwärmen.
- Die vorgewärmten Objektträger paarweise in die Emulsion eintauchen, anschließend trennen und waagrecht auf eine Glasplatte legen.
- Nach dem Antrocknen der Emulsion die Präparate in Objektträgerhalter einordnen und drei Stunden in einer lichtdichten Trocknungsapparatur belüften.
- Objektträger in Präparatekästen lichtdicht vernacken.
Zur Aufnahme von Feuchtigkeit dienen CaCl_2 -Körner.
- Exponieren der Präparate im Kühlschrank für etwa zwei Wochen.
- Entwickeln der Autoradiographien:
 - a) 2 Minuten entwickeln in KODAK D-19b bei 20°C
 - b) 30 Sekunden neutralisieren in Leitungswasser
 - c) 8 Minuten fixieren in KODAK Acid Fixer bei 20°C
 - d) 20 Minuten wässern und lufttrocknen

Die luftgetrockneten Präparate wurden in Xylol gesüßt und in Eukitt eingebettet. Die Auswertung erfolgte mit einem Leitz-Mikroskop mit Ölimmersionsobjektiv (100fach; Okulare 10fach).

Chemikalien:

Bleiacetat (PbAc) hat ein Molekulargewicht von 329,33.

Für die Analyse der DNS-Synthese unter Einwirkung von Bleiacetat wurden in 100 ml Leitungswasser 37,933 mg PbAc gelöst. von dieser Lösung wurden 0,15 ml auf 15 ml Kulturgemisch gegeben. Die Endmolarität des PbAc in der Kultur war damit 10^{-5}M .

2. Cinematographische Analysen von Leukozytenkulturen:

Es wurden Blutkulturen wie oben beschrieben entweder mit Phytohämagglutinin oder mit Pokeweed Mitogen angesetzt.

Das Blut stammte von verschiedenen hämatologisch normalen Personen (vergleiche Filmprotokoll) und von dem oben erwähnten weiblichen Spender.

Die Blutkulturen wurden im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Sofort nach Kulturansatz und nach verschiedenen Kulturzeiten wurden von diesen Blutkulturen Objektträgerkulturen angefertigt (vergleiche Filmprotokoll).

Folgende Arbeitsschritte waren dazu nötig:

- Auf einem sterilen Objektträger wurde mit einer Spritze ein Ring aus sterilem, flüssigem Paraffin aufgetragen.
- Die Blutkultur wurde kräftig geschüttelt. Mit einer Pipette wurde aus dem Kulturgefäß etwas Kulturflüssigkeit entnommen und ein kleiner Tropfen innerhalb des Paraffinringes auf den Objektträger aufgetropft.
- Der Paraffinring mit der Kultur wurde mit einem sterilen Deckglas bedeckt.

Alle Arbeitsgänge erfolgten in einer Impfkabine unter sterilen Bedingungen.

Die Objektträgerkulturen wurden unter einem Phasenkontrastmikroskop in einer auf 37°C beheizten Kammer kultiviert.

Die Lymphozyten wurden mit 100facher Vergrößerung im 15 sec oder 15 min Abstand mit einer BOLEX-Kamera-Automatik gefilmt. Es wurden 16 mm Safety cine Filme von AGFA-GEVAERT verwendet.

3. Verschiedene Kulturmedien:

Die Auswirkung unterschiedlich zusammengesetzter Medien auf den Mitoseindex bei Zwei-Tage-Kulturen wurde an folgenden Medien untersucht:

Ham's F 10 (HAM, 1963) und TC Medium 199 (MORGAN et al., 1950).

Diese Medien haben folgende Zusammensetzung:

Substanz	Ham's F 10 mg / l	TC Medium 199 mg / l
L-Phenylalanin	5.00	50.00
L-Tyrosin	1.81	40.00
L-Alanin	9.00	50.00
Glycin	7.51	50.00
L-Serin	10.50	50.00
L-Threonin	3.57	60.00
L-Isoleucin	2.60	40.00
L-Leucin	13.00	120.00
L-Prolin	11.50	40.00
L-Valin	3.50	50.00
L-Asparaginsäure	13.00	60.00
L-Glutaminsäure	14.70	150.00
L-Asparagin	13.00	-
L-Glutamin	146.00	100.00
L-Cystein	25.00	0.10
L-Arginin HCl	211.00	70.00
L-Histidin HCl	21.00	20.00
L-Lysin HCl	29.00	70.00
L-Tryptophan	0.60	20.00
L-Methionin	4.48	30.00
L-Hydroxyprolin	-	10.00
L-Cystin	-	20.00
Hypoxanthin	4.00	0.30
Biotin	0.024	0.01
Folsäure	1.32	0.01
Riboflavin	0.376	0.01
D-Ca-pantothenat	0.715	0.01
Cholin Cl	0.698	0.50
D-Inositol	0.541	0.05
Niacinamid	0.615	0.025
Pyridoxin HCl	0.206	0.025
Thiamin HCl	1.000	0.01
Thymidin	0.70	-
Vitamin B ₁₂	1.36	-
Liponsäure	0.20	-
Phenolrot	1.20	20.00
Glutathion	-	0.05

Substanz	Ham's F 10 mg / l	TC Medium 199 mg / l
Vitamin A	-	0.10
Calciferol	-	0.10
Cholesterol	-	0.20
Adenin Sulfat	-	10.00
Guanin Sulfat	-	10.00
Xanthin	-	0.30
Uracil	-	0.50
Disodium alpha tocopherol sulfat	-	0.01
Tween 80	-	20.00
Adenosintriphosphat	-	1.00
Adenylsäure	-	0.20
Desoxyribose	-	0.50
Ribose	-	0.50
Pyridoxal HCl	-	0.025
Niacin	-	0.025
Ascorbinsäure	-	0.05
Para-Aminobenzoessäure	-	0.05
Menadion	-	0.01
NaHCO_3	1200.00	350.00
NaCl	7400.00	3000.00
KCl	285.00	400.00
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	290.00	60.00
KH_2PO_4	83.00	60.00
$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0.334	-
$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	0.00249	-
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0.0233	-
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	44.00	140.00
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	153.00	200.00
Glucose	1100.00	1000.00
Na-Pyruvat	110.00	-
Na-Acetat	-	50.00

Es wurden 12 Kulturen wie oben beschrieben mit Ham's F 10 Medium und Phytohämagglutinin angesetzt.

Die Kulturen wurden mit folgenden Aminosäuren angereichert:

L-Arginin $C_6H_{14}N_4O_2$ (MERCK) (Mol-Gew. 174,20)
18,291 mg wurden in 10 ml aqua dest gelöst.
L-Cystein $C_3H_7NO_2S$ (MERCK) (Mol-Gew. 121,16)
12,722 mg wurden in 10 ml aqua dest gelöst.
L-Asparagin $C_4H_8NO_3 \cdot H_2O$ (MERCK) (Mol-Gew. 150,14)
15,765 mg wurden in 10 ml aqua dest gelöst.
L-Glutaminsäure $C_6H_9NO_4$ (MERCK) (Mol-Gew. 147,13)
15,449 mg wurden in 10 ml aqua dest gelöst.

Es wurden jeweils zu zwei Kulturen mit 5,2 ml Kulturgemisch 0,05 ml je einer der oben genannten Aminosäurelösungen getropft.

Zu zwei Kulturen mit 5,15 ml Kulturgemisch wurden 0,05 ml der Glutaminsäurelösung und 0,05 ml der Cysteinlösung gegeben.

Die Endmolarität der Aminosäuren in den Kulturen war 10^{-4} M.

Zwei Kulturen blieben ohne Aminosäurezusatz als Kontrollen.

Die Kulturen wurden im Brutschrank bei $37^{\circ}C$ kultiviert. 4 1/2 Stunden vor Aufarbeitung wurden den Kulturen $0,2 \mu g/ml$ Colcemid zugegeben. Nach 48 Stunden Kulturdauer wurde aufgearbeitet.

Die luftgetrockneten Präparate wurden mit Giemsa "Normal" gefärbt:

Dazu wurden Giemsaatlösung und Phosphatpuffer (pH 6,88; 0,0025 M) im Verhältnis 1 : 10 gemischt und filtriert.

Die Präparate wurden 8 Minuten gefärbt, in aqua dest gespült und luftgetrocknet.

Anschließend wurden sie in Xylol überführt und in Eukitt eingebettet.

Zur Bestimmung des Mitoseindex wurden pro Präparat 1000 - 5000

Zellen ausgewertet.

Es wurden 12 Kulturen wie oben beschrieben mit TC Medium 199 und Phytohämagglutinin angesetzt.

Die Kulturen wurden mit folgenden Substanzen angereichert:

Vitamin B_{12}	0,0068 mg / 5 ml Kulturgemisch
Na-Pyruvat	0,55 mg / 5 ml "
$ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$	0,000144 mg / 5 ml "
$CuSO_4 \cdot 5 H_2O$	0,00001245 mg / 5 ml "

Alle Substanzen wurden in aqua dest gelöst. Die Lösungen waren so

konzentriert, daß durch Zugabe von 0,01 ml der Lösungen auf 5 ml Kulturgemisch die gewünschte Konzentration erreicht wurde.

Zu zwei Kulturen wurde jeweils dieselbe Substanz gegeben.

Zwei Kulturen wurden mit den 4 Substanzen zusammen angereichert.

Zwei weitere Kulturen blieben ohne Substanzzugabe als Versuchskontrollen.

Die Kulturen wurden im Brutschrank bei 37°C inkubiert. 4 1/2 Stunden vor Aufarbeitung wurden die Kulturen mit 0,2 µg / ml Colcemid versetzt. Nach 48 Stunden wurde aufgearbeitet.

Die luftgetrockneten Präparate wurden mit Giemsa "Normal" gefärbt.

4. Änderungen der Konzentrationen von Serum und Phytohämagglutinin in der Ham's F 10 Kultur:

Es wurden 5 und 2,5 ml Blutkulturen wie unter 1. beschrieben angesetzt, enthielten jedoch 8% peripheres Venenblut.

Die Konzentrationen von Serum, Phytohämagglutinin und zum Ausgleich dazu von Ham's F 10 variierten wie folgt (Konzentrationsangaben in vol/vol):

5 % Fetal Bovine Serum

15 % "

20 % "

25 % "

0,8 % Phytohämagglutinin

1,6 % "

4,8 % "

9,6 % "

Die Kulturen wurden entweder in Glasgefäßen oder in 5 ml Einwegspritzen in mehreren Parallelserien kultiviert.

4 1/2 Stunden vor Aufarbeitung wurden die Kulturen mit 0,2 µg / ml Colcemid versetzt. Die Aufarbeitung erfolgte nach 48 Stunden Kulturdauer.

Die luftgetrockneten Präparate wurden mit Giemsa "Normal" gefärbt, in Xylol gespült und in Eukitt eingebettet.

5. Färbemethoden:

Zur Bestimmung der in vitro durchlaufenen Zellzyklusrunden bei 72 Stunden Kulturdauer nach Stimulierung mit Phytohämagglutinin in TC Medium 199 (a) und nach Stimulierung mit Concanavalin A in Ham's F 10 Medium (b) wurden Kulturen wie folgt angesetzt und behandelt:

a) Kulturansatz:

- 2,3 ml TC Medium 199
- 0,25 ml Foetal Bovine Serum
- 0,01 ml Penicillin/Streptomycinsulfat Gemisch
- 0,08 ml Phytohämagglutinin
- 0,2 ml peripheres Venenblut

Sofort nach Ansatz wurde der Kultur 0,01 ml einer wäßrigen Bromdesoxyuridinlösung zugegeben. Die Endmolarität war 10^{-5} M.

Vier Stunden vor Aufarbeitung wurden der Kultur 0,2 µg / ml Colcemid zugegeben. Die Aufarbeitung erfolgte bei 72 Stunden Kulturdauer.

Die luftgetrockneten Objektträger wurden 10 Minuten mit HOECHST-Farbstoff 33 258 (gelöst in aqua dest, Endkonzentration 0,5 µg / ml) nach LATT (1973) gefärbt.

b) Kulturansatz:

- 4,00 ml Ham's F 10
- 0,5 ml Foetal Bovine Serum
- 0,02 ml Penicillin/Streptomycinsulfat Gemisch
- 0,15 ml Concanavalin A
- 0,1 ml peripheres Venenblut

24 Stunden nach Ansatz wurde der Kultur 0,01 ml einer wäßrigen 5-Bromdesoxyuridinlösung zugegeben. Die Endkonzentration war 10^{-5} M. Die Kulturen wurden im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

4 1/2 Stunden vor Aufarbeitung wurde die Kultur mit 0,2 µg / ml Colcemid versetzt. 72 Stunden nach Kulturansatz wurde aufgearbeitet.

Die luftgetrockneten Präparate wurden zwei Monate in einer Glas-küvette im Kühlschrank aufbewahrt und dann nach KORENBERG und FREEDLENDER (1974) gefärbt:

- Eine Lösung aus 1 M Na_2HPO_4 mit 1/ Tabletten NaOH (pH 8) wurde im Wasserbad auf 87° - 89°C erwärmt.
- Die Präparate wurden etwa 16 Minuten in dieser Lösung bei 87°-89°C behandelt,

- kurz in aqua dest gespült und
- 12 Minuten in einer Giemsa Lösung mit folgender Zusammensetzung gefärbt:

80 ml aqua dest

20 ml Phosphatpuffer (pH 6,88)

2 ml Giemsa-Stammlösung

Die luftgetrockneten Präparate wurden sofort ausgewertet. Es wurden 204 Mitosen auf ihr Färbemuster untersucht.

III. ERGEBNISSE

ZELLZYKLUSANALYSEN

Bei der Bestimmung der Prozentsätze radioaktiv markierter Interphasekerne wurden nur solche mit aufgelockertem Chromatin berücksichtigt. Dabei wurden Zellkerne mit mehr als 20 Silberkörnern als markiert gewertet.

Markierte Lymphozytenkerne mit weniger als 20 Silberkörnern wurden in zwei Markierungsklassen unterteilt:

1. Kerne mit 1 - 5 Silberkörnern
2. Kerne mit 6 - 20 Silberkörnern

Trägt man die Prozentsätze markierter Interphasekerne über der Kulturdauer auf, erhält man eine Kurve, die den Verlauf der DNS-Synthese in der Zellpopulation anzeigt.

Die Mitoseindices geben Aufschluß über die Zellteilungsaktivität in der Kultur.

V e r s u c h 1:

Ham's F 10 - Phytohämagglutinin - Leukozytenkultur:

Es wurden 500 - 1514 Lymphozytenkerne pro Kulturstunde auf Markierung mit mehr als 20 Silberkörnern untersucht. Der Mitoseindex wurde nach Auswertung von jeweils 1000 Zellen bestimmt (Tabellen 1 und 2).

Die DNS-Synthese beginnt bei 28 Stunden Kulturdauer. Ein erstes Synthesemaximum tritt bei etwa 35 Stunden mit 13% (Serie A) und 9% (Serie B) markierten Interphasekernenauf. Ein zweites Maximum folgt nach etwa 6 Stunden mit 14% (Serie A) und 10% (Serie B) markierten Interphasekernen. Dieser biphasische Verlauf der DNS-Synthese bleibt über die gesamte untersuchte Kulturdauer erkennbar.

Der höchste Prozentsatz an markierten Interphasekernen wurde bei 74 Stunden Kulturdauer mit 40% (Serie A) gefunden.

Erste Mitosen traten 37 Stunden nach Kulturansatz auf. Die meisten Mitosen wurden bei 58 Stunden Kulturdauer gefunden (MI = 2%).

Abbildung 1:

Ham's F 10 - Phytohämagglutinin - Leukozytenkultur

Prozentsätze markierter Interphasekerne (linke Ordinate)
und Mitoseindices (rechte Ordinate) in Abhängigkeit von der
Kulturdauer (Abszisse) zwischen 23 und 74 Stunden Kulturdauer

● ——— ● Serie A
○ ----- ○ Serie B

markierte Interphasekerne
0 10 20 30 40 50%

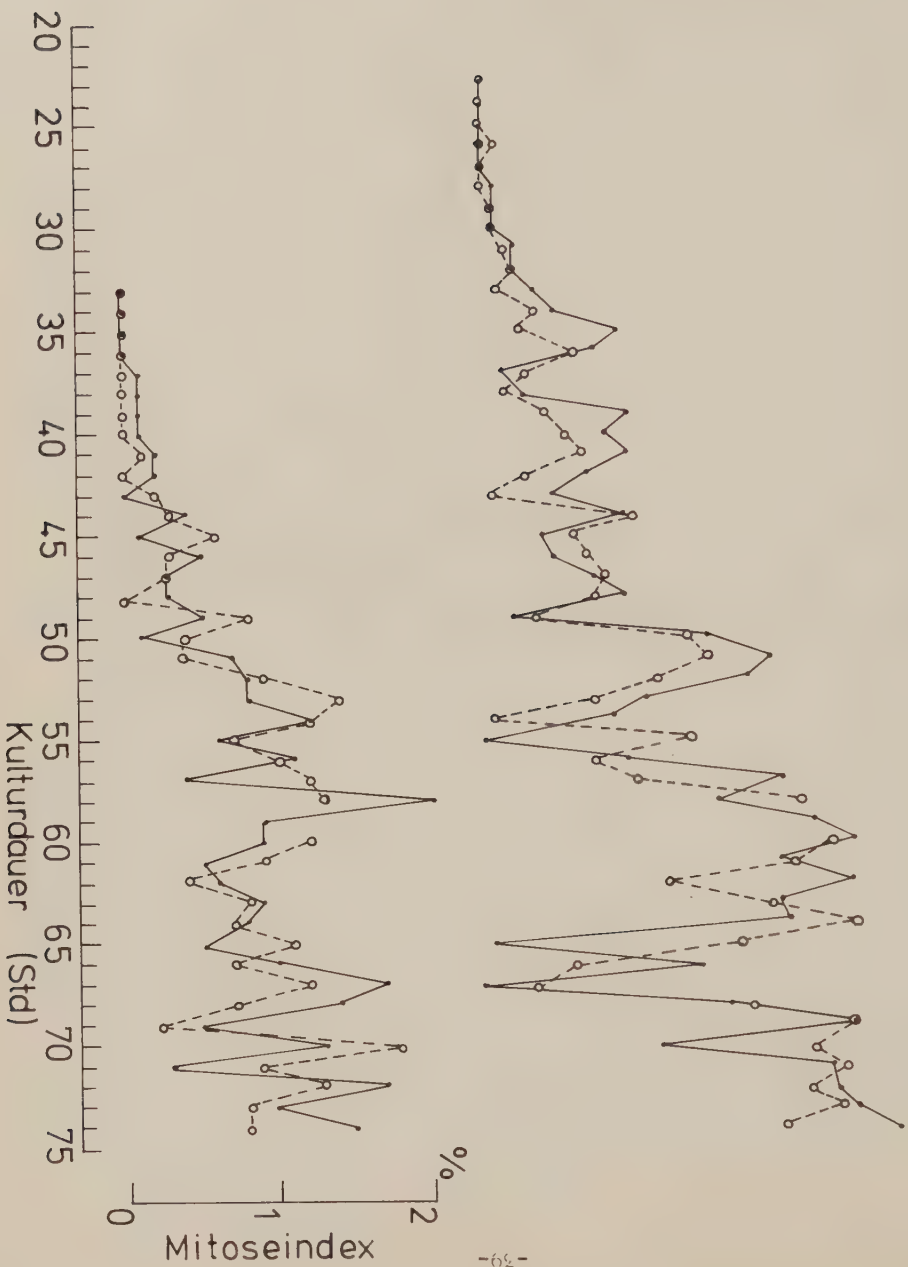


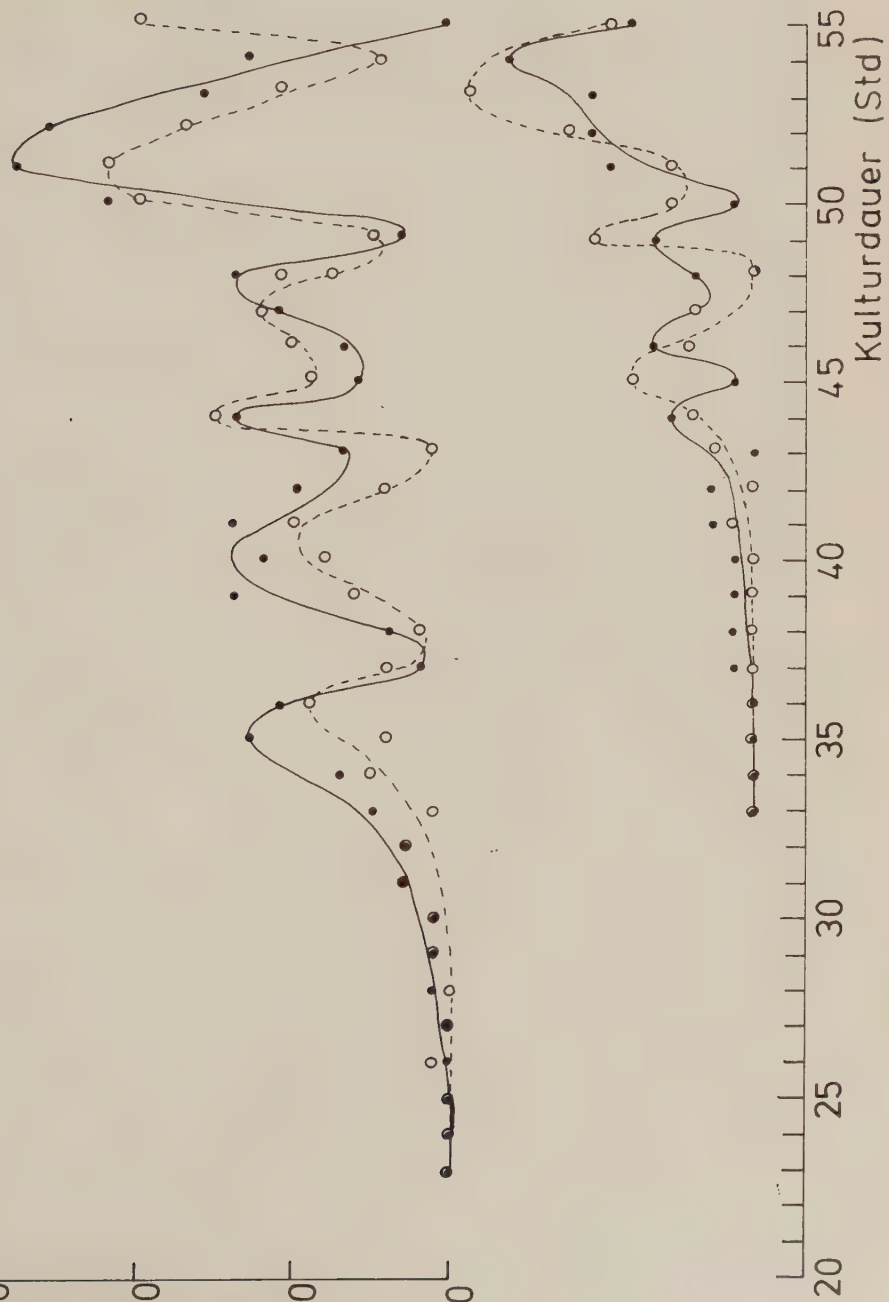
Abbildung 2:

Ham's F 10 - Phytohämagglutinin - Leukozytenkultur

Prozentsätze markierter Interphasekerne (linke Ordinate)
und Mitoseindices (rechte Ordinate) in Abhängigkeit von der
Kulturdauer (Abszisse) zwischen 23 und 55 Stunden Kulturdauer.

● ————— ● Serie A
○ - - - - - ○ Serie B

35%
30%
20%
10%
0



%

V e r s u c h 2:

TC Medium 199 - Phytohämagglutinin - Leukozytenkultur:

Pro Kulturstunde wurden 500 - 1000 Lymphozytenkerne mit aufgelockertem Chromatin auf ihre Markierung untersucht. Der Mitoseindex wurde nach Auswertung von jeweils 1000 Zellen bestimmt (Tabellen 3 und 4).

Markierte Interphasekerne (mehr als 20 Silberkörner) treten ab 28 Stunden Kulturdauer auf. Die DNS-Synthesekurve zwischen 23 und 72 Stunden Kulturdauer steigt langsam und unregelmäßig an. Der Anstieg wird durch ein Minimum bei etwa 60 Stunden Kulturdauer mit 3,6% (Serie A) und 6,2% (Serie B) markierten Interphasekernen unterbrochen. Bis 55 Stunden Kulturdauer ist die DNS-Syntheseaktivität in der Kultur sehr niedrig. Es wurden maximal 17,5% markierte Interphasekerne (bei 53 Stunden in Serie B) gefunden.

Mitosen wurden vereinzelt ab 38 Stunden Kulturdauer gefunden. Regelmäßig traten Mitosen ab 44 Stunden auf. Der höchste Mitoseindex wurde bei 74 Stunden (Serie A) mit 15 Mitosen auf 1000 Zellen gefunden. Bis 48 Stunden Kulturdauer erreichen die Mitoseindizes maximal einen Wert von 0,1%.

Zur Bestimmung der in vitro durchlaufenen Zellzyklusrunden bis 72 Stunden Kulturdauer wurde zu einer TC Medium 199-Kultur 5-Bromdesoxyuridin gegeben. Die DNS-synthetisierenden Zellen bauen 5-Bromdesoxyuridin statt Thymidin in die neusynthetisierte DNS ein. Nach Färbung mit HOECHST-Farbstoff 33 258 wurden die Präparate unter einem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet:

Metaphasechromosomen von Zellen, die den ersten Zellzyklus durchlaufen, fluoreszieren in beiden Chromatiden. In Metaphaseplatten von Zellen in der zweiten Zellzyklusrunde fluoresziert jeweils eine Chromatide der Chromosomen stark. Die Fluoreszenz kann von einer Chromatide auf die andere überwechseln, was auf Schwesterstrang austausch hindeutet. Bei Metaphasechromosomen von Zellen in der dritten Zellzyklusrunde treten stark fluoreszierende Abschnitte auf einzelnen Chromatiden auf. Viele Chromosomen einer Metaphaseplatte sind jedoch ohne kräftige Fluoreszenz.

Es wurden 310 Metaphaseplatten ausgewertet; davon waren

74 (= 23,8%) erste Mitosen

142 (= 45,81%) zweite Mitosen

94 (= 30,32%) dritte Mitosen

Abbildung 3:

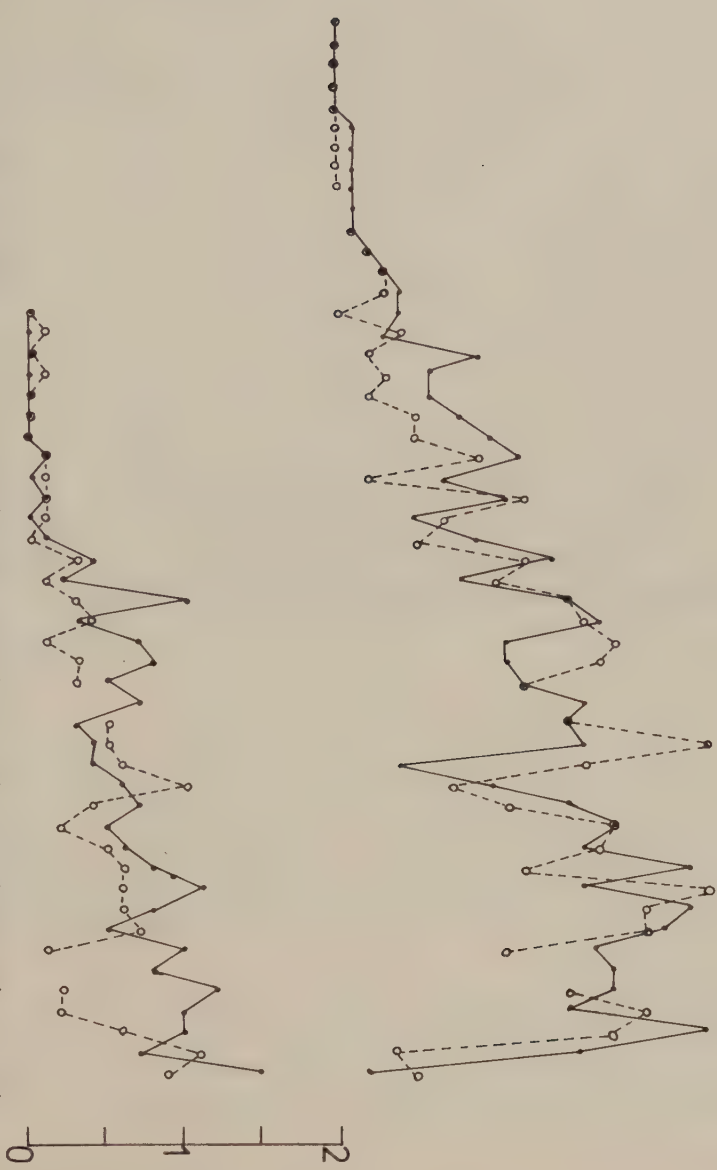
TC-Medium 199 - Phytohemagglutinin - Leukozytenkultur

Prozentsätze markierter Internphasekerne (linke Ordinate)
und Mitoseindices (rechte Ordinate) in Abhängigkeit von der
Kulturdauer (Abszisse) zwischen 23 und 74 Stunden Kulturdauer

● ——— ● Serie A
○ ——— ○ Serie B

markierte Interphasekerne
0 10 20 30 %

20 25 30 35 40 45 50 55 60 65 70 75
Kulturdauer (Std)



Mitoseindex %

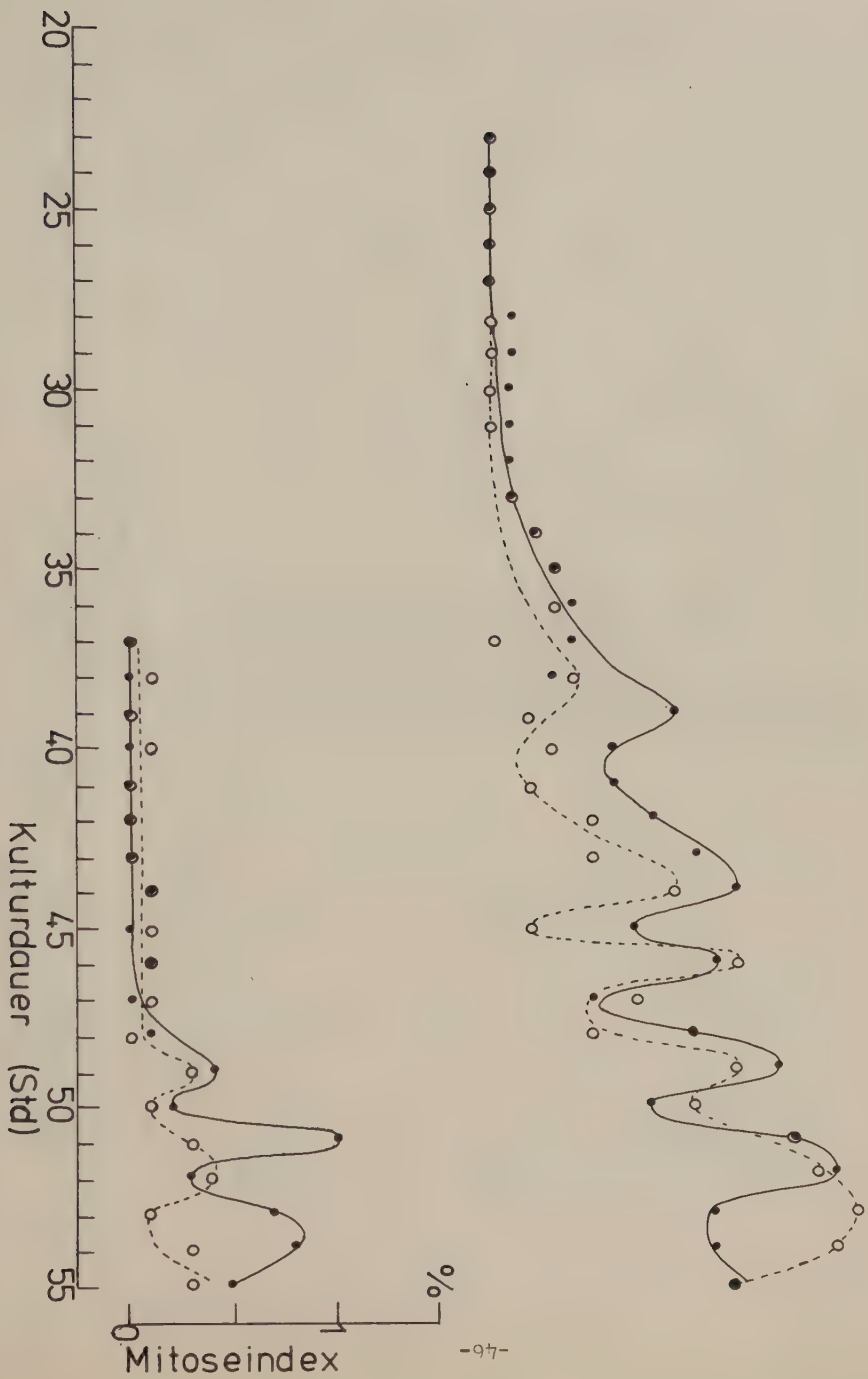
Abbildung 4:

TC Medium 199 - Phytohämagglutinin - Leukozytenkultur

Prozentsätze markierter Interphasekerne (linke Ordinate) und
Mitoseindices (rechte Ordinate) in Abhängigkeit von der
Kulturdauer (Abszisse) zwischen 23 und 55 Stunden Kulturdauer

● ——— ● Serie A
○ ———— ○ Serie B

markierte Interphasekerne
0 10 20 %



Vergleich: Ham's F 10 - Phytohämagglutinin - Leukozytenkultur mit
TC Medium 199 - Phytohämagglutinin - Leukozytenkultur

Der verlauf der DNS-Synthese ist in beiden Kulturen ähnlich. Zur veranschaulichung sind in Abbildung 5 die Kurvenbilder der DNS-Synthese und der Mitoseindices zwischen 23 und 55 Stunden Kulturdauer einander gegenübergestellt.

In beiden Kulturen beginnt die DNS-Synthese etwa 28 Stunden nach Kulturansatz. In Ham's F 10-Kulturen tritt das erste Synthesemaximum bei etwa 35 Stunden Kulturdauer auf; ein zweites Maximum folgt etwa 6 Stunden später. In TC Medium 199-Kulturen liegt das erste Synthesemaximum bei etwa 39 Stunden Kulturdauer; ein zweites Maximum folgt etwa 5 Stunden später. Bis 55 Stunden Kulturdauer treten in beiden Kulturen 5 Maxima auf.

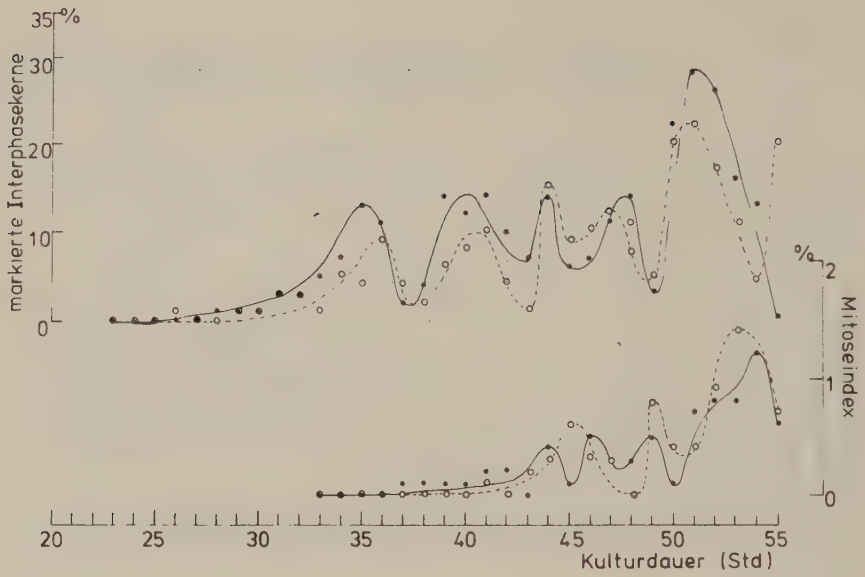
Die Prozentsätze an markierten Interphasekernen liegen in TC Medium 199-Kulturen insgesamt niedriger als in Ham's F 10-Kulturen.

Mitosen treten in Kulturen mit TC Medium 199 später auf als in Kulturen mit Ham's F 10 Medium.

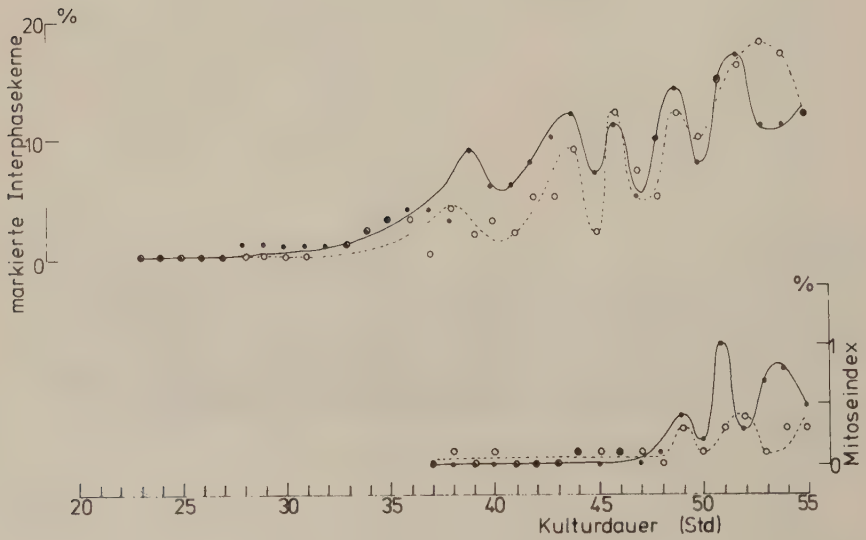
Abbildung 5:

Gegenüberstellung der Prozentsätze markierter Interphasekerne (linke Ordinate) und der Mitoseindices (rechte Ordinate) der

Versuche: Ham's F 10 Medium + Phytohämagglutinin (Versuch 1) und
TC Medium 199 + Phytohämagglutinin (Versuch 2)



Versuch 1



Versuch 2

Versuch 3:

Concanavalin A - Ham's F 10 - Leukozytenkultur:

Es wurden in Serie A Lymphozytenkerne und Kerne polymorphkerniger Leukozyten auf ihre Markierung hin untersucht. In Serie B wurden nur Lymphozytenkerne auf Markierung mit mehr als 20 Silberkörnern geprüft. Zur Bestimmung des Mitoseindex wurden jeweils 1000 Zellen ausgewertet. Die Ergebnisse sind in den Tabellen 5 - 7 zusammengestellt.

Stark markierte Interphasekerne treten schon bei 20 Stunden Kulturdauer auf. Intensive DNS-Syntheseaktivität ist zwischen 20 und 33 Stunden Kulturdauer mit einem Maximalwert von 84,4% markierten Interphasekernen zu verzeichnen. Bis 46 Stunden Kulturdauer bleibt die Syntheseaktivität danach gering: es wurden maximal 15,2% markierte Interphasekerne gefunden. Nach 46 Stunden Kulturdauer steigt die DNS-Syntheseaktivität wieder an. Der Verlauf der DNS-Synthesekurve ist zu den Zeiten erhöhter Syntheseaktivität nicht stetig.

Mitosen treten ab 41 Stunden Kulturdauer auf. Der Mitoseindex bleibt bis 57 Stunden Kulturdauer mit maximal 4 Mitosen auf 1000 Zellen sehr niedrig.

Viele Lymphozytenkerne mit einem relativ kleinen Kernumfang und nur leicht aufgelockertem Chromatin zeigen nach Stimulierung mit Concanavalin A deutliche Markierung (Abb. 6). Die Silberkörner bedecken z.T. die gesamte Kernoberfläche; wegen der kleinen Fläche treten jedoch kaum über 20 Silberkörner auf, so daß diese Lymphozytenkerne vorwiegend in der Kategorie 2 der Markierung (6-20 Silberkörner) erfaßt wurden.

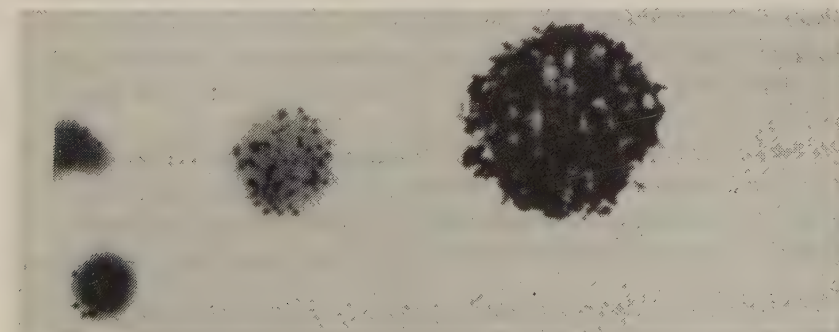


Abbildung 6: markierte Lymphozytenkerne bei 46 Stunden Kulturdauer aus Serie B

Das Kurvenbild aus den Prozentsätzen der markierten Lymphozytenkerne (über 5 Silberkörner) in Abhängigkeit von der Kulturdauer verdeutlicht eine intensive DNS-Syntheseaktivität zwischen 20 und 57 Stunden Kulturdauer (Abb. 9). Der höchste Prozentsatz an markierten Lymphozytenkernen (97%) wurde bei 32 Stunden Kulturdauer gefunden.

In Leukozytenkulturen mit Concanavalin A zeigen auch polymorphe Leukozytenkerne Markierung (Abb. 7). Sie fallen vorwiegend in die Kategorie 2 der Markierung (6-20 Silberkörner).

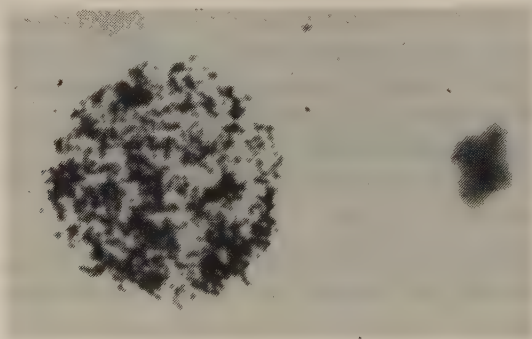


Abbildung 7: Ein markierter polymorpher Leukozytenkern neben einem markierten Interphasekern bei 52 Stunden Kulturdauer (Serie A)

Das Kurvenbild aus den Prozentsätzen der markierten Polymorphkernigen (über 5 Silberkörner) in Abhängigkeit von der Kulturdauer ähnelt dem Kurvenbild aus den Prozentsätzen markierter Lymphozytenkerne (über 5 Silberkörner) in Abhängigkeit von der Kulturdauer (Abbildungen 9 und 10). Die Minima und Maxima stimmen zeitlich gut überein und weichen auch in den Prozentsätzen nicht über 15% voneinander ab.

Es muß daher auch das Kurvenbild aus den Prozentsätzen aller markierter Leukozytenkerne (Lymphozytenkerne und polymorphe Leukozytenkerne mit mehr als 5 Silberkörnern) in Abhängigkeit von der Kulturdauer mit diesen beiden Kurvenbildern übereinstimmen (Abb. 11).

In der Concanavalin A-Leukozytenkultur variieren die Anteile der polymorphkernigen Leukozyten mit der Kulturdauer (Abb. 12).

Zwischen 20 und 57 Stunden Kulturdauer verringert sich der Anteil insgesamt nur wenig: bei 20 Stunden sind 40,2% der Zellkerne polymorph, bei 57 Stunden 35,2%. Es ist jedoch eine starke Streuung um diese Werte zu verzeichnen, insbesondere zwischen 34 und 45 Stunden Kulturdauer: die ungeraden Stunden erreichen Werte von maximal 57,4% und minimal 45%, die geraden Stunden von maximal 7,4% und minimal 4,0%.

Zur Bestimmung der in vitro durchlaufenen Zellzyklusrunden bis 72 Stunden Kulturdauer wurden Concanavalin A-stimulierte Lymphozyten einer Blutkultur mit 5-Bromdesoxyuridin markiert. DNS-synthetisierende Zellen bauen 5-Bromdesoxyuridin bei Überschuß statt Thymidin in die neusynthetisierte DNS ein.

Nach Färbung der Präparate nach der Methode von KORENBERG und FREEDLENDER (1974) zeigen Metaphasechromosomen von Zellen, die ihre erste Mitose durchlaufen, gleichmäßige Färbung ihrer Chromatiden. Bei Metaphasechromosomen zweiter Mitosen färbt sich nur eine Chromatide kräftig an, und es wird Schwesterstrangtausch beobachtet, d.h. es sind abwechselnd Abschnitte der einen und der anderen Chromatide gefärbt. Bei dritten Mitosen sind nicht alle Chromosomen einer Metaphasenplatte kräftig angefärbt. Die kräftige Färbung ist unregelmäßig über die Chromatiden verteilt.

Es wurden 204 Metaphasenplatten ausgewertet. Es stammten:

67		(= 32,84%)	aus ersten Mitosen
73	"	(= 35,78%)	aus zweiten Mitosen
64	"	(= 31,37%)	aus dritten Mitosen

Abbildung 8:

Concanavalin A - Ham's F 10 - Leukozytenkultur

Prozentsätze markierter Internphasekerne (linke Ordinate)
und Mitoseindices (rechte Ordinate) in Abhängigkeit von der
Kulturdauer (Abszisse)

● ————— ● Serie A
○ ———— ○ Serie B

markierte Interphasekerne

100-%

90
80
70
60
50
40
30
20
10
0

20 25 30 35 40 45 50 55 60

Kulturdauer (Std)

% 1
0
Mitoseindex

Abbildung 9:

Concanavalin A - Ham's F 10 - Leukozytenkultur

Prozentsätze der markierten Lymphozytenkerne mit mehr als 5 Silberkörnern (Ordinate) in Abhängigkeit von der Kulturdauer (Abszisse)

markierte Lymphozytenkerne

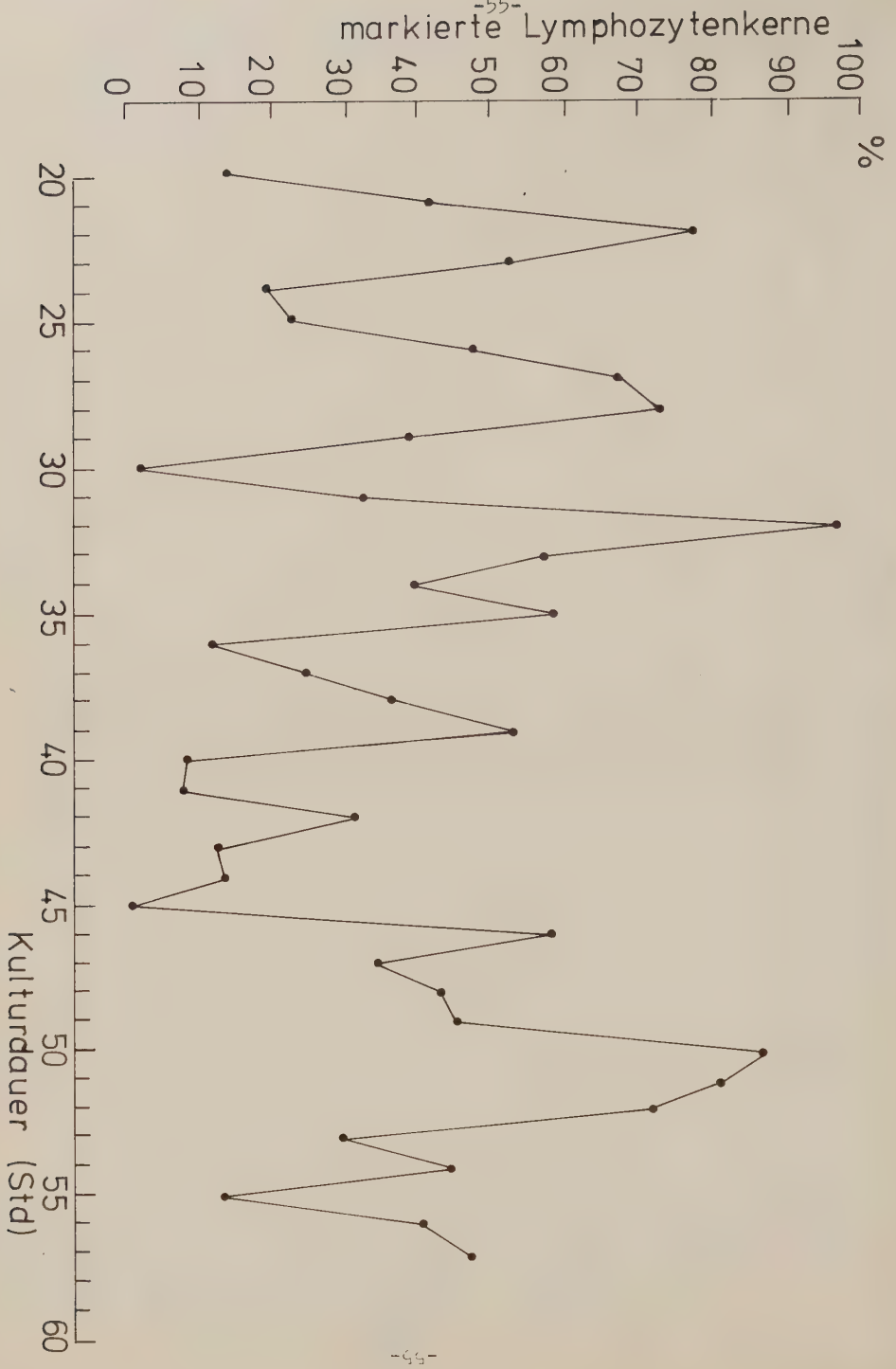


Abbildung 10:

Concanavalin A - Ham's F 10 - Leukozytenkultur

Prozentsätze markierter Polymorphkerniger mit mehr als 5 Silberkörnern (Ordinate) in Abhängigkeit von der Kulturdauer (Abszisse)

markierte Polymorphkernige

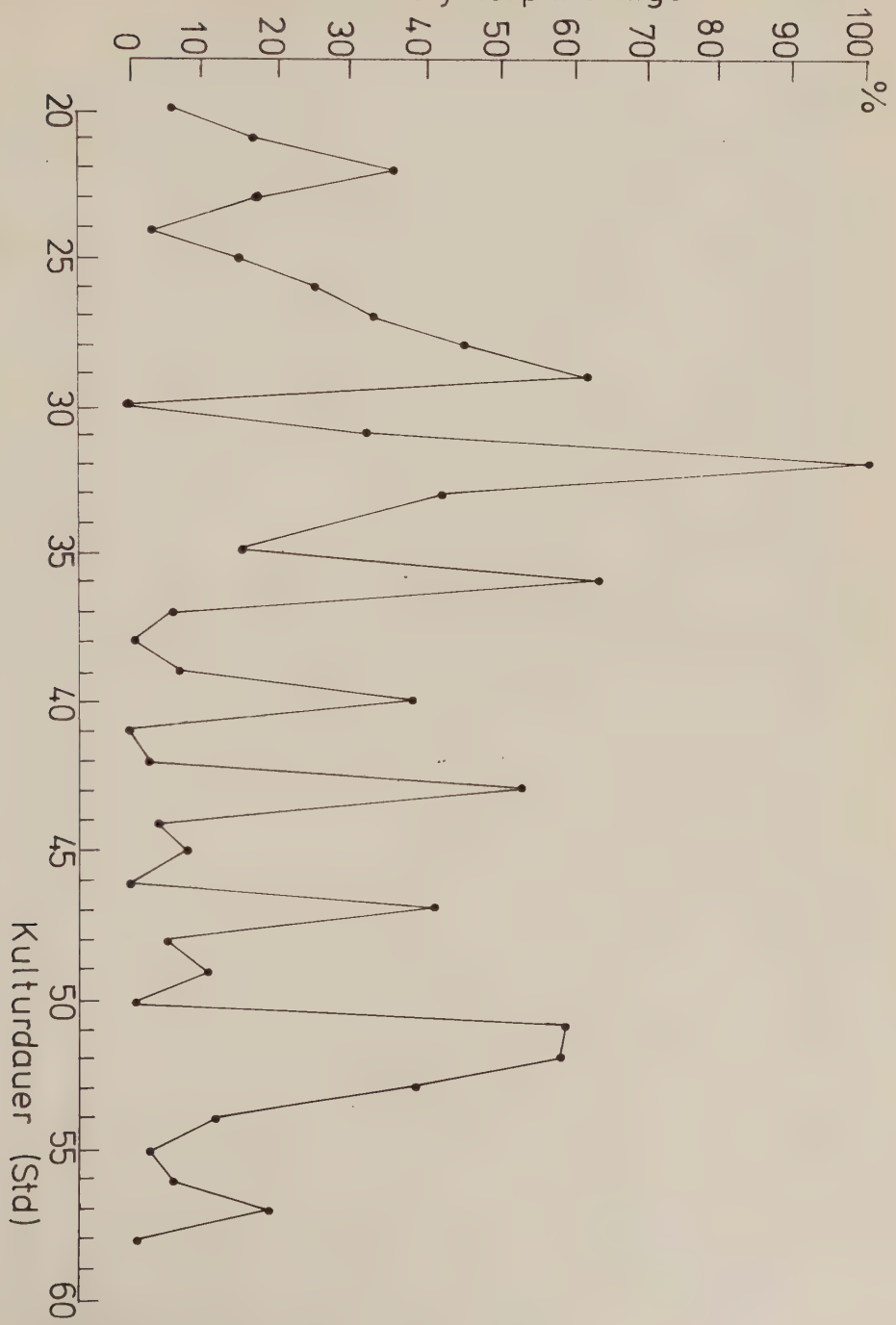


Abbildung 11:

Concanavalin A - Ham's F 10 - Leukozytenkultur

Prozentsätze markierter Leukozytenkerne (Lymphozytenkerne + polymorphe Leukozytenkerne) mit mehr als 5 Silberkörnern (Ordinate) in Abhängigkeit von der Kulturdauer (Abszisse)

markierte Leukozytenkerne

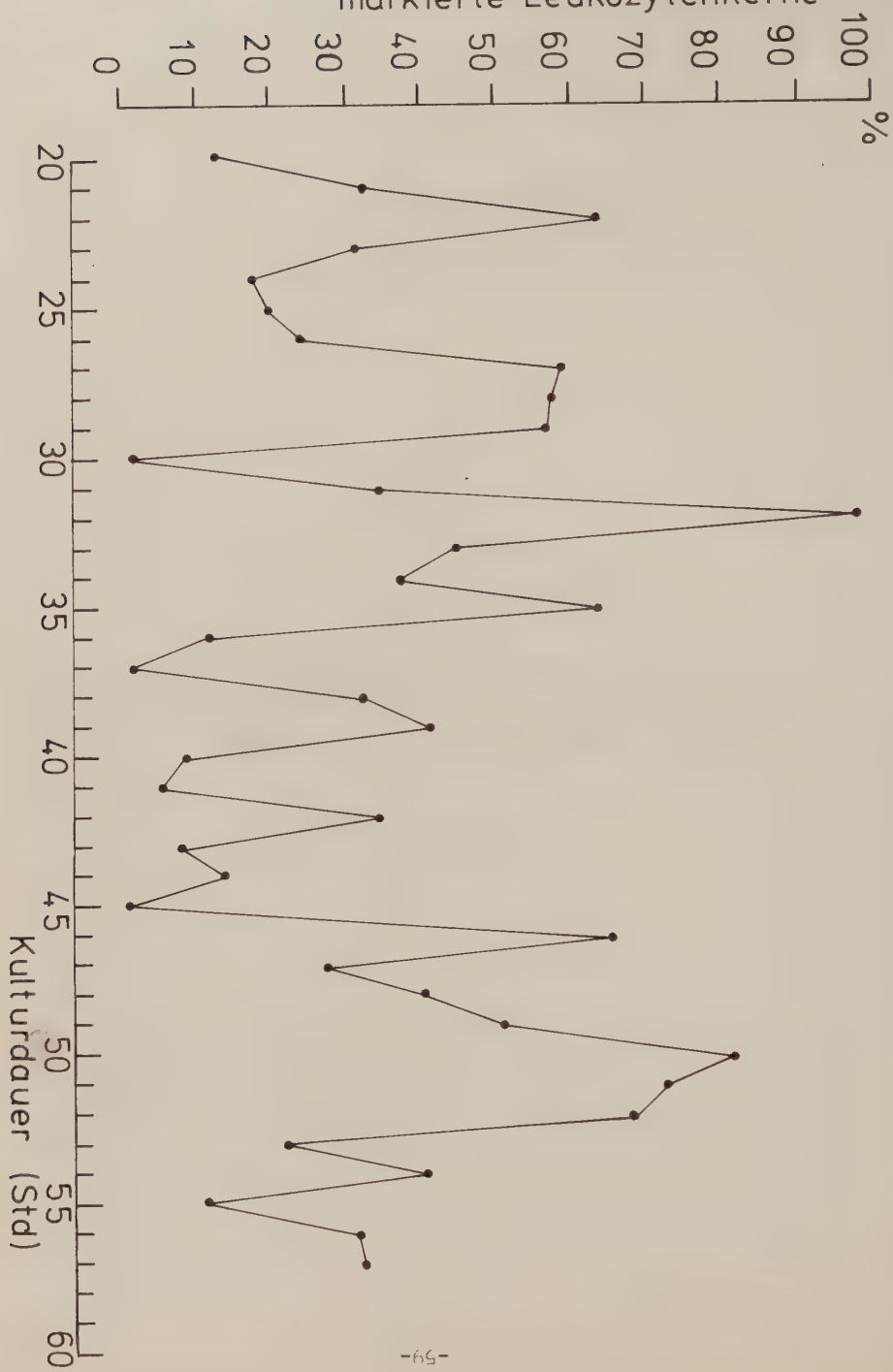
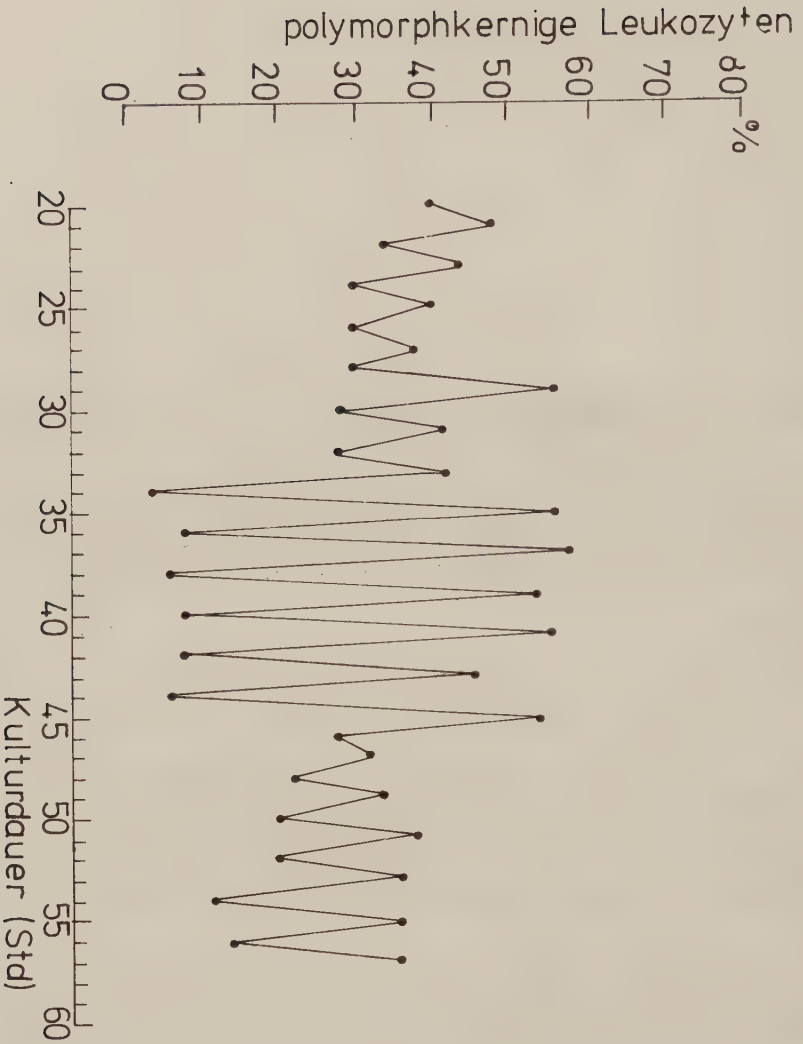


Abbildung 12:

Concanavalin A - Ham's F 10 - Leukozytenkultur

Anteile an polymorphen Leukozytenkernen (%) (Ordinate) unter den Zellkernen in Abhängigkeit von der Kulturdauer (Abszisse)



V e r s u c h 4:

Pokeweed Mitogen - Ham's F 10 - Leukozytenkultur

Es wurden 1000 - 2000 Lymphozytenkerne pro Kulturstunde unter Berücksichtigung der drei Markierungskategorien (bis 5 Silberkörner, 6-20 und über 20 Silberkörner) ausgewertet. Zur Bestimmung der Mitoseindices wurden jeweils 1000 Zellen ausgewertet (Tabellen 8 und 9).

Die DNS-Synthese beginnt 31 Stunden nach Kulturansatz. Die Prozentsätze markierter Interphasekerne steigen zwischen 31 und 74 Stunden Kulturdauer langsam und unregelmäßig an. Maximal wurden 21,4% markierte Interphasekerne (Serie B) gefunden. Die DNS-Syntheseaktivität ist insgesamt in der Drei-Tage-Kultur niedrig.

Mitosen wurden ab 33 Stunden Kulturdauer gefunden. Regelmäßig traten Mitosen in der Kultur ab 39 Stunden auf. Der größte Mitoseindex war bei 73 Stunden Kulturdauer (Serie A) mit 17 Mitosen auf 1000 Zellen.

Es wurden die Prozentsätze markierter Lymphozytenkerne mit mehr als 20 Silberkörnern (Abb. 13) und die Prozentsätze markierter Lymphozytenkerne mit mehr als 5 Silberkörnern (Abb. 14) über der Kulturdauer aufgetragen. Beide Kurvenbilder ähneln sich: die Prozentsätze markierter Lymphozytenkerne mit mehr als 5 Silberkörnern sind nur wenig höher als die Prozentsätze markierter Lymphozytenkerne mit mehr als 20 Silberkörnern.

Abbildung 13:

Pokeweed Mitogen - Ham's F 10 - Leukozytenkultur

Prozentsätze markierter Interphasekerne (linke Ordinate)
und Mitoseindices (rechte Ordinate) in Abhängigkeit von der
Kulturdauer (Abszisse)

● ——— ● Serie A
○ ——— ○ Serie B

markierte Interphasekerne
0 10 20 30 %

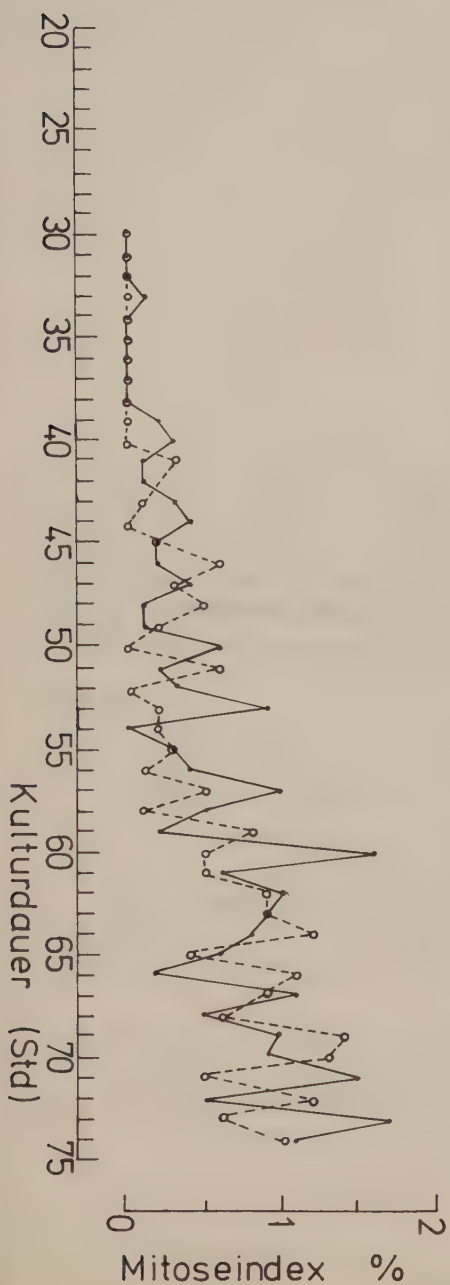
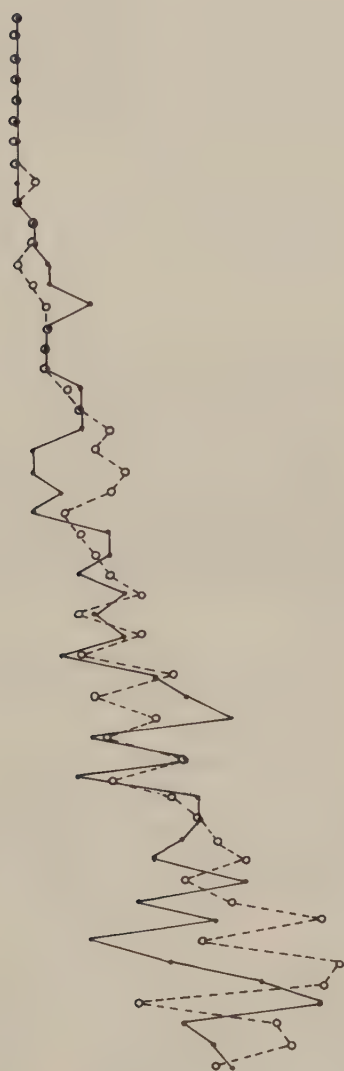
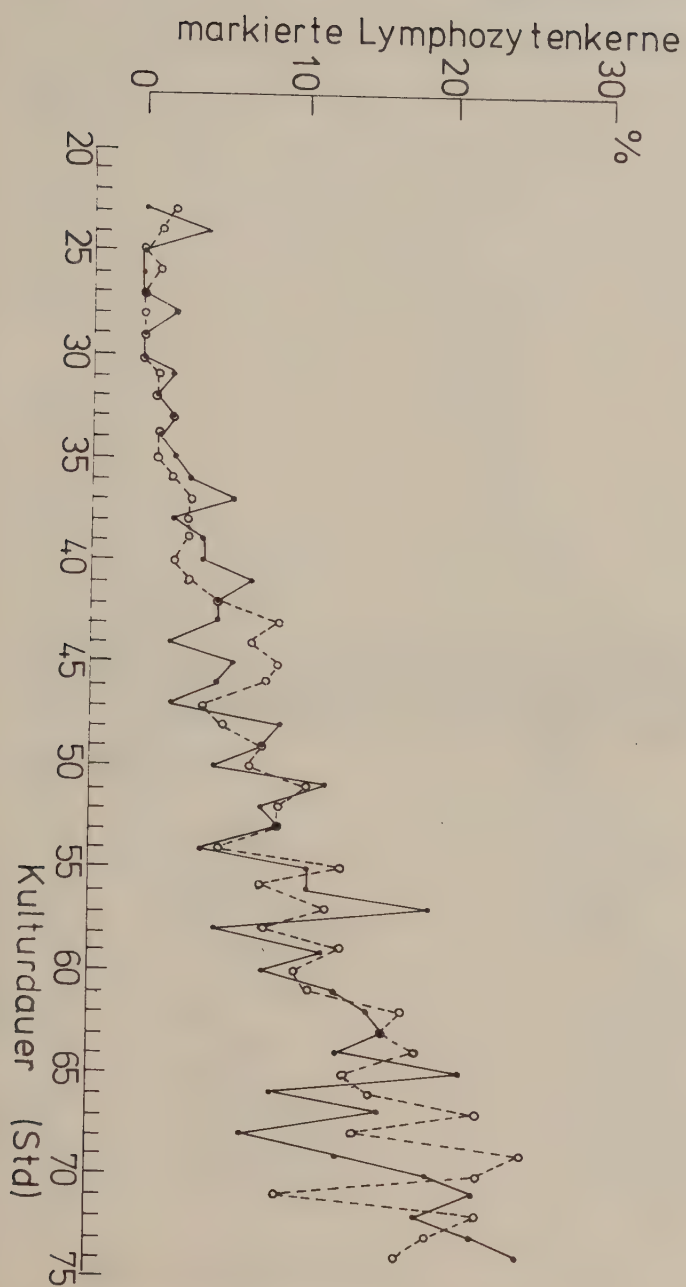


Abbildung 14:

Pokeweed Mitogen - Ham's F 10 - Leukozytenkultur

Prozentsätze markierter Lymphozytenkerne mit mehr als 5 Silberkörnern (Ordinate) in Abhängigkeit von der Kulturdauer (Abszisse)

● ——— ● Serie A
○ ——— ○ Serie B



V_e_r_s_u_c_h_5:

Lipopolysaccharid - Ham's F 10 - Leukozytenkultur

Es wurden 1000 Zellkerne (Lymphozytenkerne und polymorphe Leukozytenkerne) pro Kulturstunde auf Markierung untersucht. Zur Bestimmung der Mitoseindices wurden jeweils 3000 Zellen ausgewertet (Tabellen 10 bis 12).

Der Verlauf der DNS-Synthesekurve zwischen 23 und 74 Stunden Kulturdauer (Abb. 17) verdeutlicht hohe DNS-Syntheseaktivität zwischen 25 und 35 Stunden und zwischen 60 und 65 Stunden Kulturdauer. Die DNS-Syntheseaktivität ist in Serie B stärker als in Serie A. Während der anderen Kulturzeiten wurden maximal nur 6% markierte Interphasekerne gefunden.

Mitosen traten vereinzelt ab 33 Stunden Kulturdauer auf. Ab 66 Stunden wurden regelmäßig Mitosen gefunden, jedoch maximal nur 4 Mitosen unter 3000 Zellen.

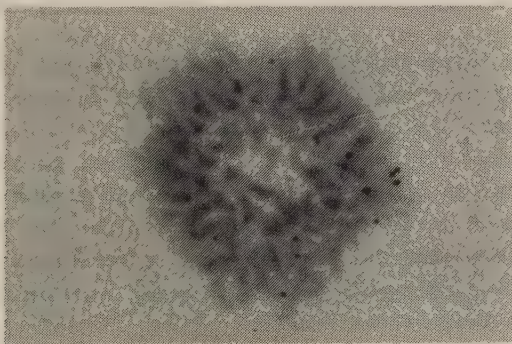


Abbildung 15: Mitose in einer Lipopolysaccharid-Kultur bei 68 Stunden Kulturdauer (Serie B)

Viele Lymphozytenkerne mit einem relativ geringen Kernumfang zeigen deutliche Markierung. Diese Lymphozytenkerne wurden vorwiegend in der Kategorie 2 der Markierung (6-20 Silberkörnchen) erfaßt.

Das Kurvenbild der Prozentsätze markierter Lymphozytenkerne mit mehr als 5 Silberkörnchen in Abhängigkeit von der Kulturdauer (Abb. 18) verdeutlicht eine intensive DNS-Syntheseaktivität. Maximal waren 97% der Lymphozytenkerne markiert (bei 27 und 33 Stunden Kulturdauer in Serie B). Die DNS-Syntheseaktivität steigt mehrmals sehr steil innerhalb von 1 oder 2 Stunden auf ein Maximum an und fällt ebenso schnell wieder fast auf den Nullwert ab.

Nach Stimulierung einer Leukozytenkultur mit Lipopolysaccharid sind auch Kerne polymorphkerniger Leukozyten markiert (Abb. 16).



Abbildung 16: markierter polymorpher Leukozytenkern neben einem Lymphozytenkern bei 27 Stunden Kulturdauer (Serie B)

Die markierten Polymorphkernigen haben überwiegend zwischen 6 und 20 Silberkörner über der Kernoberfläche. Die markierten Polymorphkernigen mit mehr als 20 Silberkörnern wurden mit den markierten Lymphozytenkernen mit mehr als 20 Silberkörnern zusammengefaßt, und die Prozentsätze in Abbildung 19 über der Kulturdauer aufgetragen. Das Kurvenbild unterscheidet sich nicht von dem der Prozentsätze markierter Interphasekerne über der Kulturdauer (Abb. 17). Die Prozentsätze sind nur wenig erhöht. Dagegen ergeben die Prozentsätze der markierten polymorphen Leukozytenkerne mit mehr als 5 Silberkörnern über der Kulturdauer (Abb. 20) ein Kurvenbild, das dem der Prozentsätze markierter Lymphozytenkerne mit mehr als 5 Silberkörnern ähnelt. Die Maxima und Minima weichen höchstens um 15% voneinander ab.

Die Anteile polymorphkerniger Leukozyten an 1000 Zellen (%) sind in Abbildung 21 über der Kulturdauer aufgetragen. Zwischen 23 und 74 Stunden Kulturdauer treten die Polymorphkernigen unregelmäßig verteilt auf. Insgesamt verringert sich ihr Anteil an den Zellen in der Kultur bis 74 Stunden. Dieser Abfall erfolgt in vier Stufen: zwischen 23 und 35 Stunden, zwischen 36 und 49 Stunden, zwischen 50 und 60 Stunden und zwischen 61 und 74 Stunden Kulturdauer. Der Anfang einer jeden Stufe wird durch einen neuen steilen Anstieg im Anteil der polymorphkernigen Leukozyten an den Zellen gekenn-

zeichnet. Bei Serie B treten in der zweiten Stufe sogar mehr Polymorphkernige auf (44,4%) als in der ersten Stufe (40,4%). Zwischen 50 und 60 Stunden Kulturdauer waren die Anteile der polymorphkernigen Leukozyten an den Zellen am niedrigsten (maximal 18,1%, minimal 3,4%). Die vierte Stufe zwischen 61 und 74 Stunden Kulturdauer fällt bis minimal 9,6% Polymorphkernige ab.

Abbildung 17:

Lipopolysaccharid - Läm's F 10 - Leukozytenkultur

Prozentsätze markierter Interphasekerne (linke Ordinate) und Mitoseindizes (rechte Ordinate) in Abhängigkeit von der Kulturdauer (Abszisse)

● ——— ● Serie A
○ ——— ○ Serie B

markierte Interphasekerne

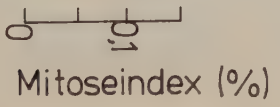
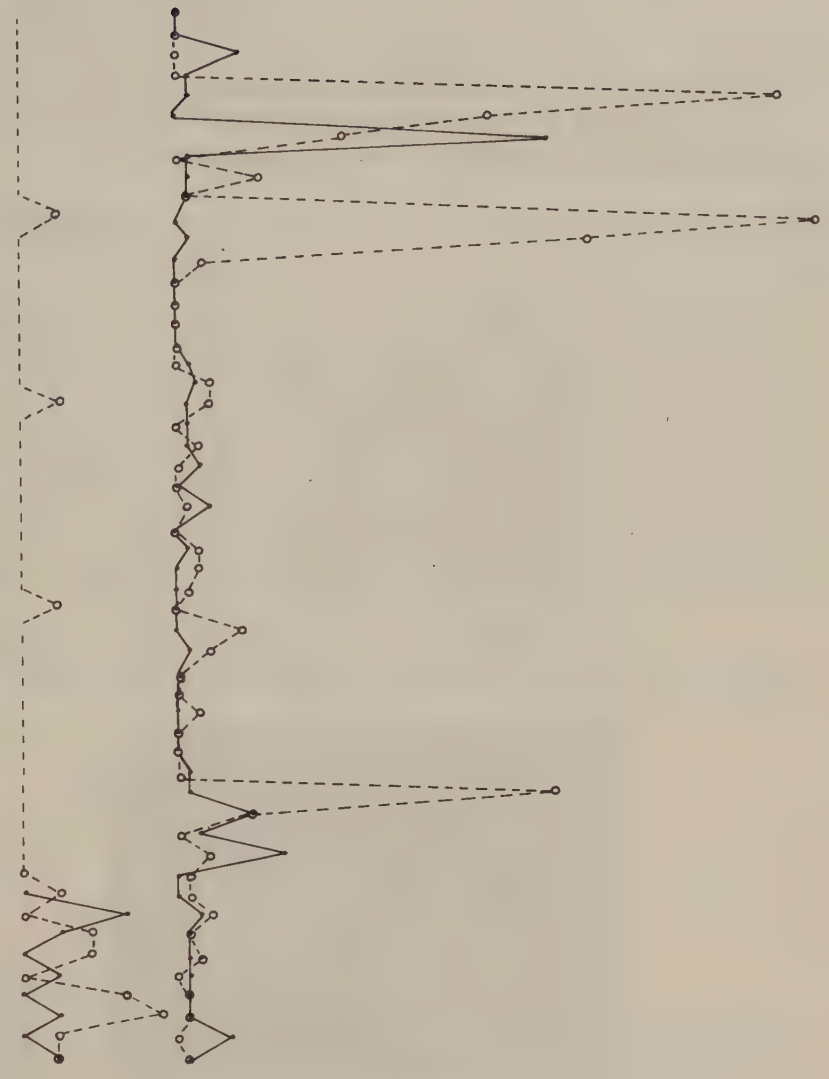
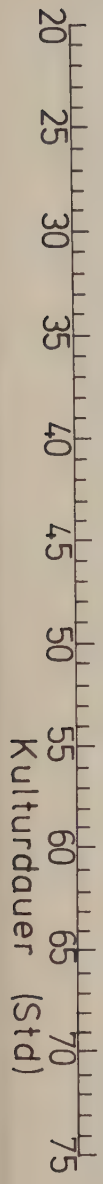
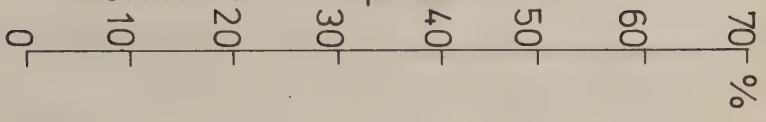


Abbildung 18:

Lipopolysaccharid - Ham's F 10 - Leukozytenkultur

Prozentsätze markierter Lymphozytenkerne mit mehr als 5 Silberkörnern (Ordinate) in Abhängigkeit von der Kulturdauer (Abszisse)

• ——— • Serie A
o ----- o Serie B

markierte Lymphozytenkerne

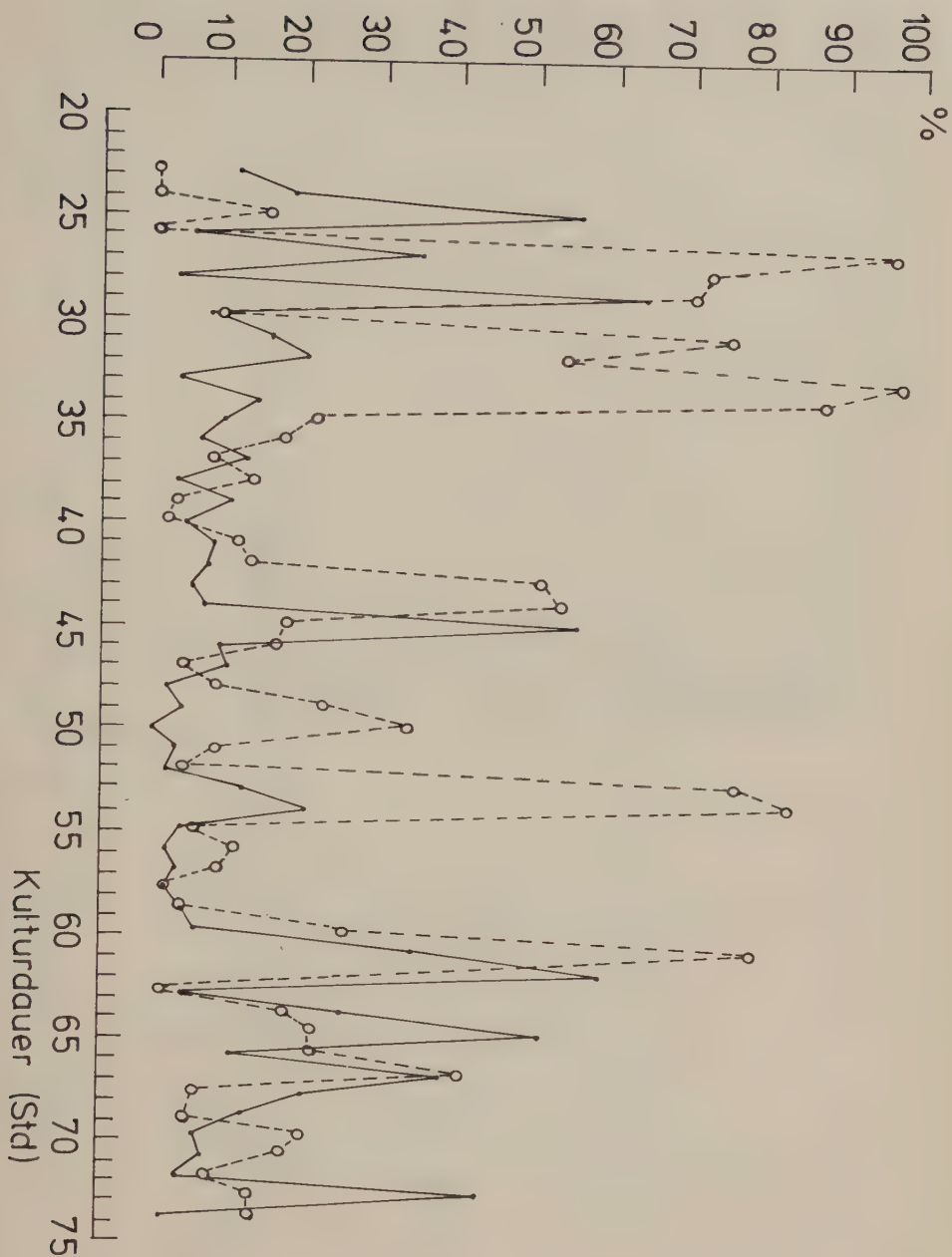


Abbildung 19:

Linopolysaccharid - Ham's F 10 - Leukozytenkultur

Prozentsätze markierter Leukozytenkerne (Lymphozytenkerne und polymorphe Leukozytenkerne) mit mehr als 20 Silberkörnern (Ordinate) in Abhängigkeit von der Kulturdauer (Abszisse)

o ----- o Serie A
o ----- o Serie B

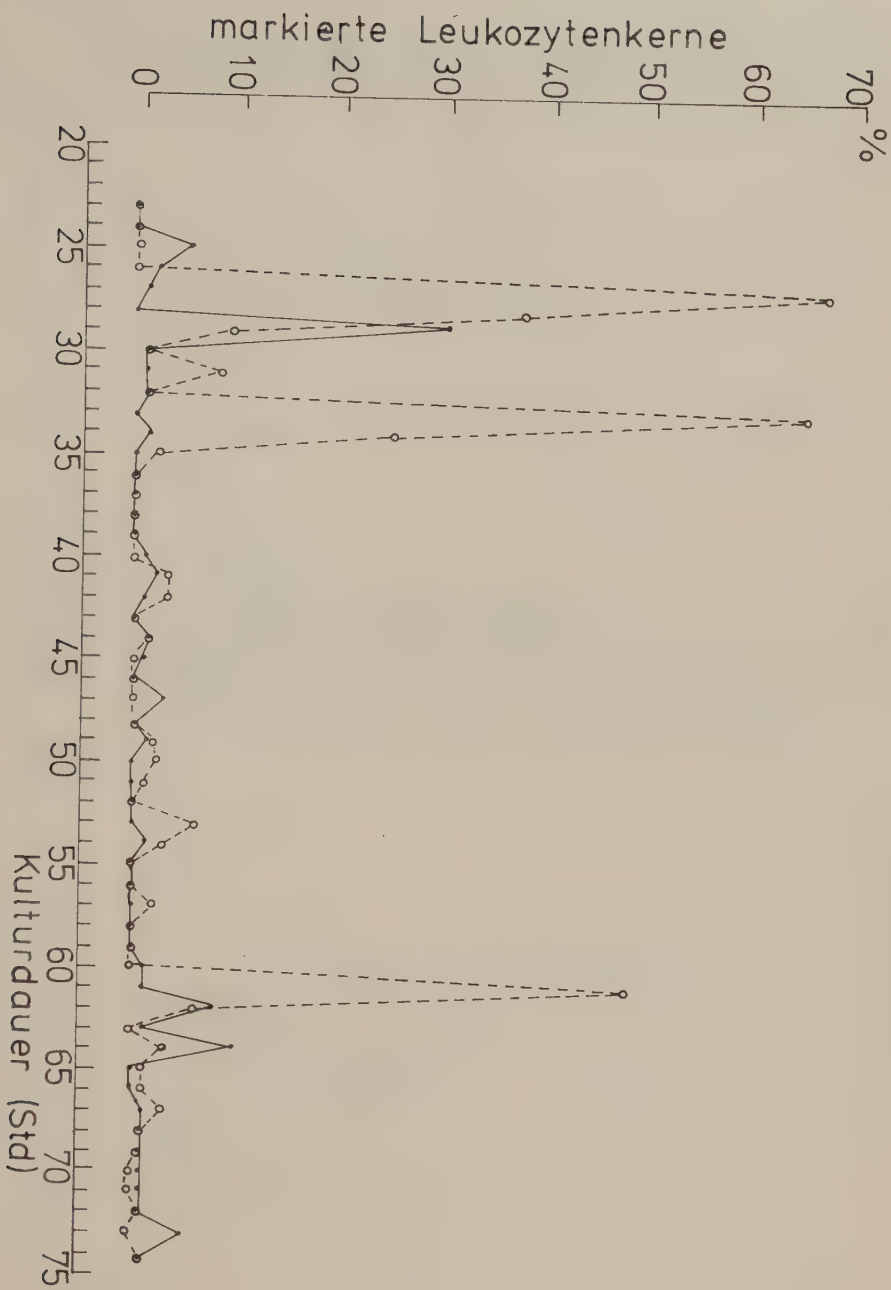


Abbildung 20:

Lipopolysaccharid - Ham's R 10 - Leukozytenkultur

Prozentsätze markierter polymorpher Leukozytenkerne mit mehr als
5 Silberkörnern (Ordinate) in Abhängigkeit von der Kulturdauer
(Abszisse)

● ————— ● Serie A
○ ———— ○ Serie B

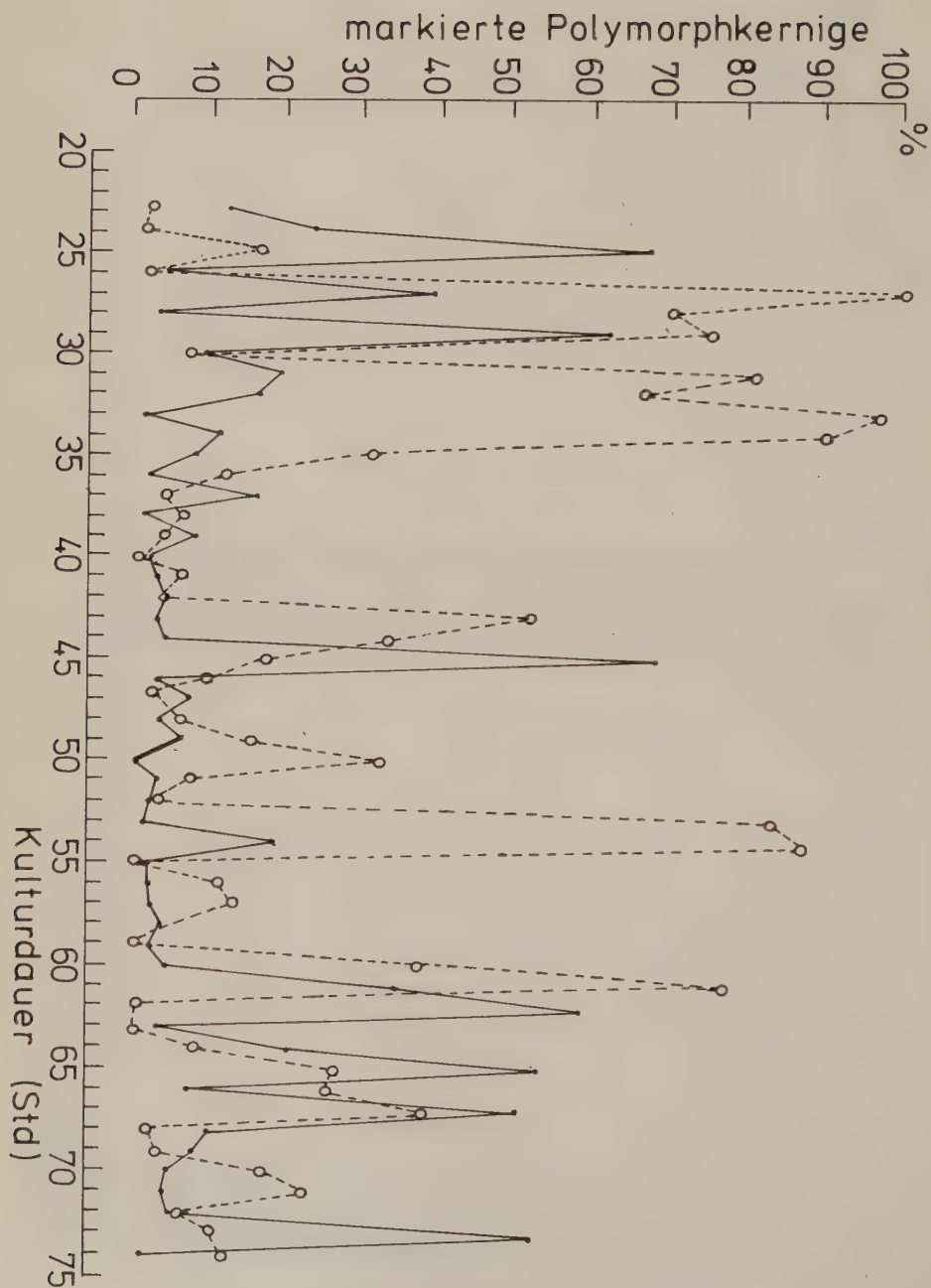


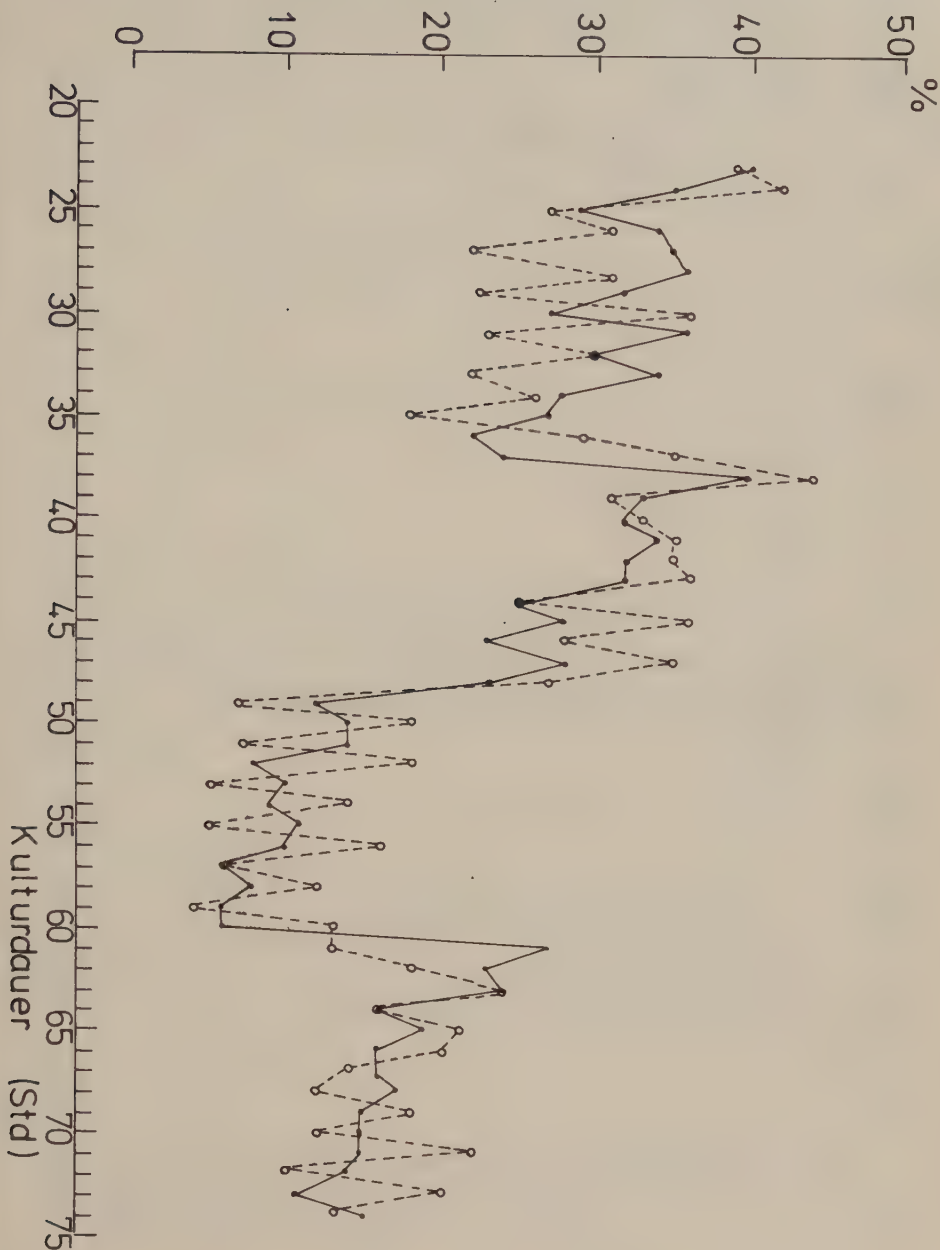
Abbildung 21:

Linopolysaccharid - Ham's F 10 - Leukozytenkultur

Anteile polymorphkerniger Leukozyten an 1000 Zellen (%) (Ordinate)
in Abhängigkeit von der Kulturdauer (Abszisse)

● ——— ● Serie A
○ ———— ○ Serie B

polymorphkernige Leukozyten



Vergleich: Phytohämagglutinin - Ham's F 10 - Leukozytenkultur
Concanavalin A - Ham's F 10 - Leukozytenkultur
Pokeweed Mitogen - Ham's F 10 - Leukozytenkultur
Lipopolysaccharid - Ham's F 10 - Leukozytenkultur

In Abbildung 22 sind die DNS-Synthesekurven der vier Kultursysteme einander gegenübergestellt.

Die DNS-Synthese beginnt in Kulturen mit:

Phytohämagglutinin (PHA)	bei 26 Stunden Kulturdauer
Concanavalin A (Con A)	vor 20 Stunden "
Pokeweed Mitogen (PWM)	bei 31 Stunden "
Lipopolysaccharid (LPS)	bei 25 Stunden "

Der Verlauf der DNS-Synthesekurven ist in den vier Kultursystemen vollkommen unterschiedlich.

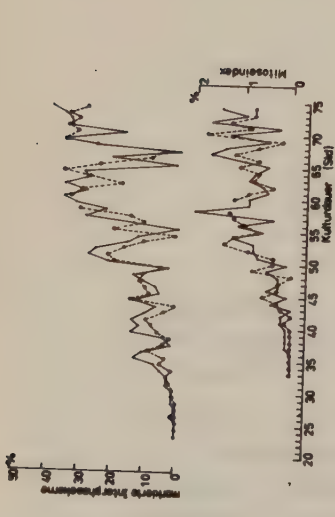
Mitosen treten regelmäßig auf in Kulturen mit:

PHA	ab 37 Stunden Kulturdauer (maximal 2% bis 72 Stunden)
Con A	ab 41 Stunden " (maximal 0,4% bis 57 Stunden)
PWM	ab 39 Stunden " (maximal 1,7% bis 72 Stunden)
LPS	ab 66 Stunden " (maximal 0,13% bis 72 Stunden)

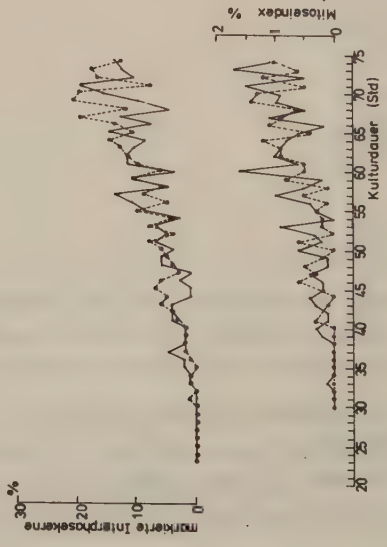
Abbildung 22:

Gegenüberstellung der Prozentsätze markierter Interphasekerne (linke Ordinate) und der Mitoseindices (rechte Ordinate) in Abhängigkeit von der Kulturdauer (Abszisse) der Versuche:

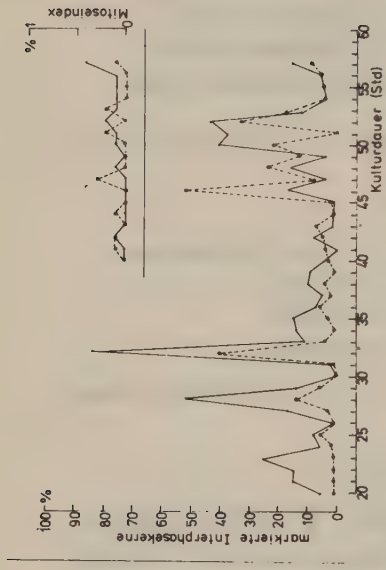
Phytohämagglutinin - Ham's F 10 - Leukozytenkultur (Versuch 1)
Concanavalin A - Ham's F 10 - Leukozytenkultur (Versuch 3)
Pokeweed Mitogen - Ham's F 10 - Leukozytenkultur (Versuch 4)
Lipopolysaccharid - Ham's F 10 - Leukozytenkultur (Versuch 5)



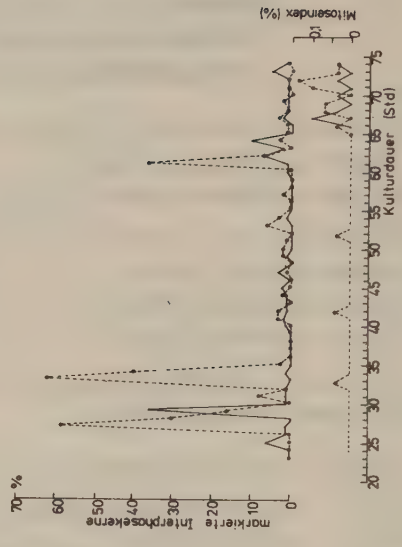
Versuch 1



Versuch 4



Versuch 3



Versuch 5

V e r s u c h 6:

Phytohämagglutinin - Ham's F 10 - Leukozytenkultur mit 10^{-5} M Bleiacetat (PbAc)

Die Prozentsätze markierter Lymphozytenkerne und die Mitoseindices aus den Serien A - D sind in den Tabellen 13 - 16 aufgeführt.

Serie A:

In Gegenwart von 10^{-5} M Bleiacetat beginnt die DNS-Synthese bei 26 Stunden Kulturdauer. Bis 55 Stunden erscheinen in der DNS-Synthesekurve fünf Maxima (Abb. 23):

- | | | |
|--|---|---|
| 1. Maximum bei 30 Stunden mit 10,67% markierten Interphasekernen | | |
| 2. Maximum bei 34 Stunden mit 14,5% | " | " |
| 3. Maximum bei 42 Stunden mit 37,33% | " | " |
| 4. Maximum bei 46 Stunden mit 52,33% | " | " |
| 5. Maximum bei 52 Stunden mit 47,5% | " | " |

Es liegt vom optischen Bild her nahe, das 1. und 2. Maximum als Einheit I neben die Maxima 3 und 4 als Einheit II zu stellen. Ein solches Paar deutet sich nach Maximum 4 nochmals an. Die Maxima jedes Paares liegen jeweils 4 Stunden auseinander. Der Abstand zwischen Maximum 2 (34 Stunden) und Maximum 3 (42 Stunden) beträgt 8 Stunden und der Abstand zwischen Maximum 4 (46 Stunden) und Maximum 5 (52 Stunden) beträgt 6 Stunden.

Die Kurve der Mitoseindices zeigt ein Maximum bei 42 Stunden Kulturdauer, mit 1,4% Mitosen und ein Maximum bei etwa 50 Stunden mit 1,8% Mitosen. Nach 54 Stunden ist ein neuer Anstieg in der Kurve zu verzeichnen.

Serie B:

Zwischen 24 und 50 Stunden Kulturdauer treten in der DNS-Synthesekurve drei Maxima auf (Abb. 23):

- | | | |
|---|---|---|
| 1. Maximum bei 32 Stunden mit 13% markierten Interphasekernen | | |
| 2. Maximum bei 36 Stunden mit 26% | " | " |
| 3. Maximum bei 48 Stunden mit 43% | " | " |

Mitosen wurden ab 40 Stunden Kulturdauer gefunden.

Serien C und D:

Diese beiden Serien wurden als Parallelversuche angesetzt.

Das in den Serien A und B beschriebene Bild der DNS-Synthesekurve ist auch in den Serien C und D erkennbar: je zwei Maxima folgen immer im Abstand von 2 - 6 Stunden aufeinander (Abb. 24).

In Serie C treten zwischen 23 und 52 Stunden Kulturdauer 7 Maxima auf:

bei 29 Stunden (3,8% markierte Interphasekerne)

bei 31 Stunden (9,6% " ")

bei ca. 38 Stunden (23% " ")

bei 41 Stunden (24% " ")

bei 46 Stunden (32,8% " ")

bei 49 Stunden (34,8% " ")

bei 51 Stunden (34,4% " ")

In Serie D treten zwischen 23 und 52 Stunden Kulturdauer 6 Maxima auf:

bei 26 Stunden (2,5% markierte Interphasekerne)

bei 32 Stunden (9% " ")

bei 37 Stunden (20% " ")

bei 41 Stunden (23,2% " ")

bei 47 Stunden (31% " ")

bei 51 Stunden (28% " ")

Mitosen traten nach 38 Stunden Kulturdauer auf. Die Kurve der Mitoseindices steigt unregelmäßig an und erreicht bis 52 Stunden einen maximalen Wert von 2% Mitosen.

Abbildung 23:

Phytohämagglutinin - Hem's F 10 - Leukozytenkultur mit
 10^{-5} M Bleiacetat (PbAc)

Frozensätze markierter Interphasekerne (linke Ordinate) und
Mitoseindices (rechte Ordinate) in Abhängigkeit von der Kultur-
dauer (Abszisse)

● ——— ● Serie A
○ ——— ○ Serie B

markierte Interphasekerne

0 10 20 30 40 50 60%

20 25 30 35 40 45 50 55 60

Kulturdauer (Std)

0 1 2 3%

Mitoseindex

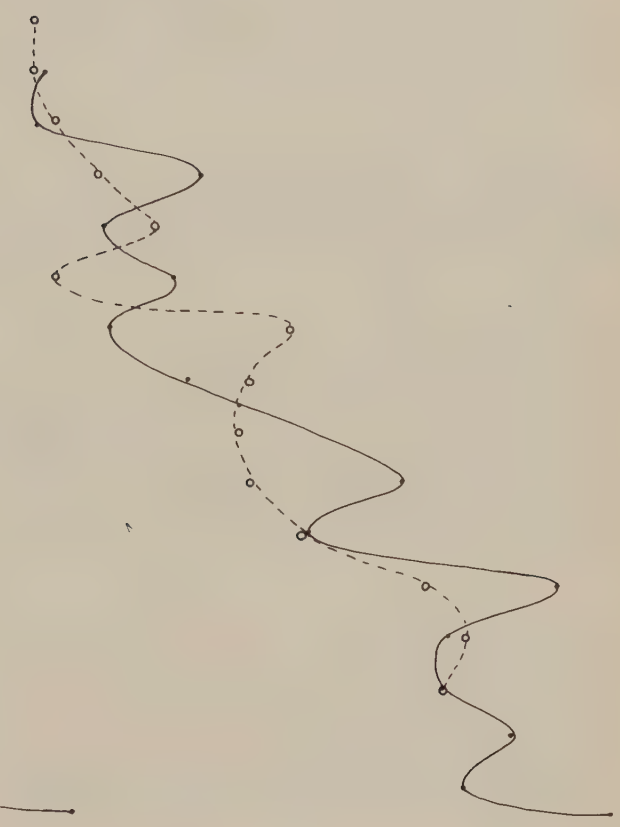
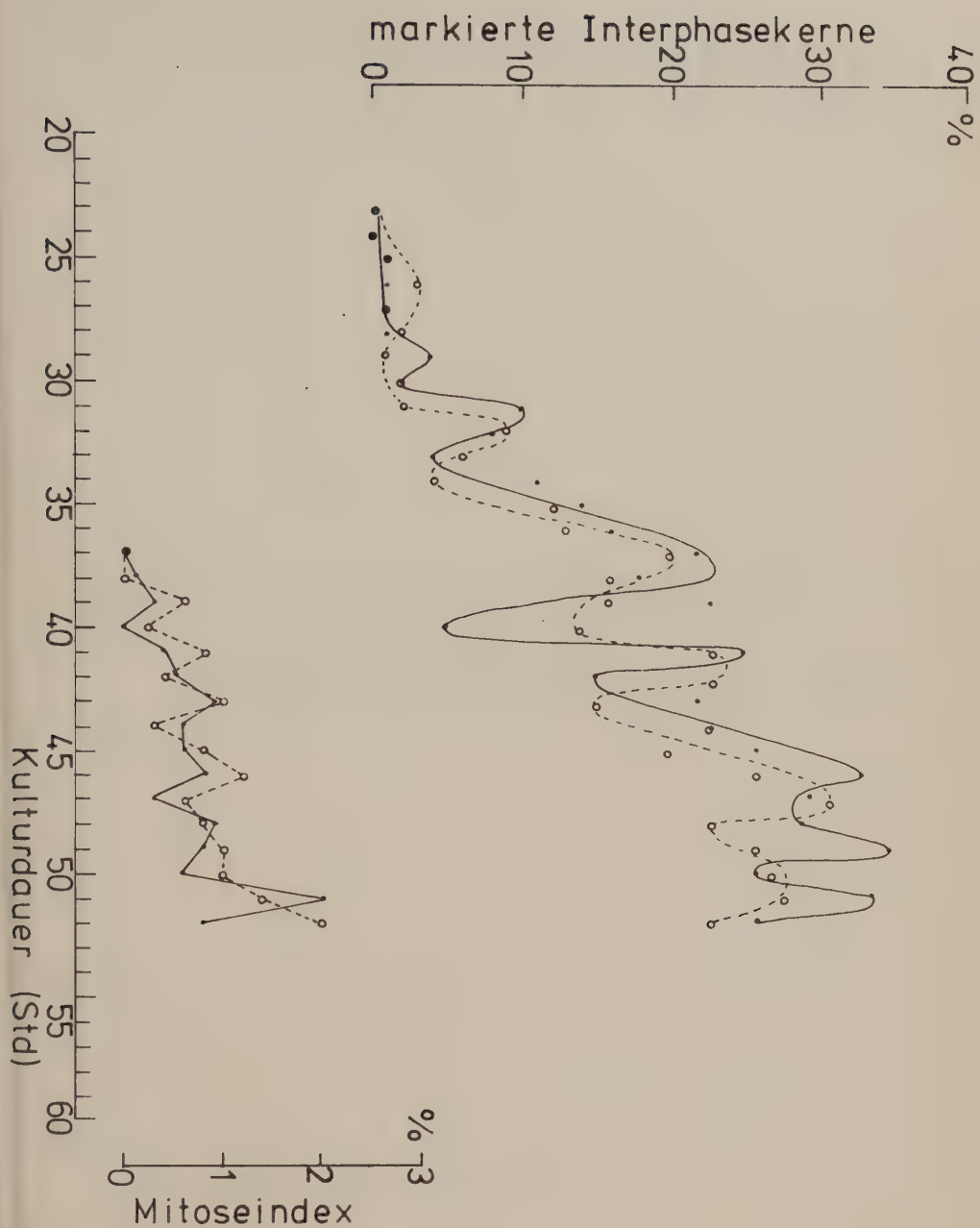


Abbildung 24:

Phytohemagglutinin - Ham's F 10 - Leukozytenkultur mit
 10^{-5} M Bleiacetat (PbAc)

Prozentsätze markierter Interphasekerne (linke Ordinate) und
Mitoseindices (rechte Ordinate) in Abhängigkeit von der Kultur-
dauer (Abszisse)

● ——— ● Serie C
○ ———— ○ Serie D



V e r s u c h 6:

Beeinflussung der Mitoseindices der Ham's F 10 - Leukozytenkultur und der TC Medium 199 - Leukozytenkultur

Zur Bestimmung der Mitoseindices wurden pro Präparat 1000 - 2000 Zellen ausgewertet. Es wurden pro Versuch mindestens 2 Präparate ausgewertet.

In den Tabellen 17 - 20 sind die Ergebnisse zusammengestellt. Abbildung 25 zeigt die Mittelwerte der Mitoseindices aus den einzelnen Versuchsreihen graphisch dargestellt.

In der Ham's F 10-Kultur streuten die Mitoseindices bei 48 Stunden Kulturdauer nach 4 1/2 stündiger Colcemideinwirkung zwischen 1,7% und 5,5%.

Schwankungen der Serumkonzentration im Bereich zwischen 5 Vol.% und 25 Vol.% und der Phytohämagglutininkonzentration zwischen 0,8 Vol.% und 9,6 Vol.% bewirken keine signifikante Änderung des Mitoseindex im Vergleich mit der Kontrolle.

Eine Anreicherung von Ham's F 10-Medium mit Aminosäuren (hier: L-Asparagin, L-Arginin, L-Glutamin und L-Cystein) erhöhen den Mitoseindex gegenüber der Kontrolle. Die Erhöhung ist jedoch nicht signifikant. Eine Anreicherung mit L-Cystein und L-Glutamin zusammen bewirkt eine Erhöhung des Mitoseindex, die fast in den Bereich der signifikanten Abweichung von der Kontrolle fällt.

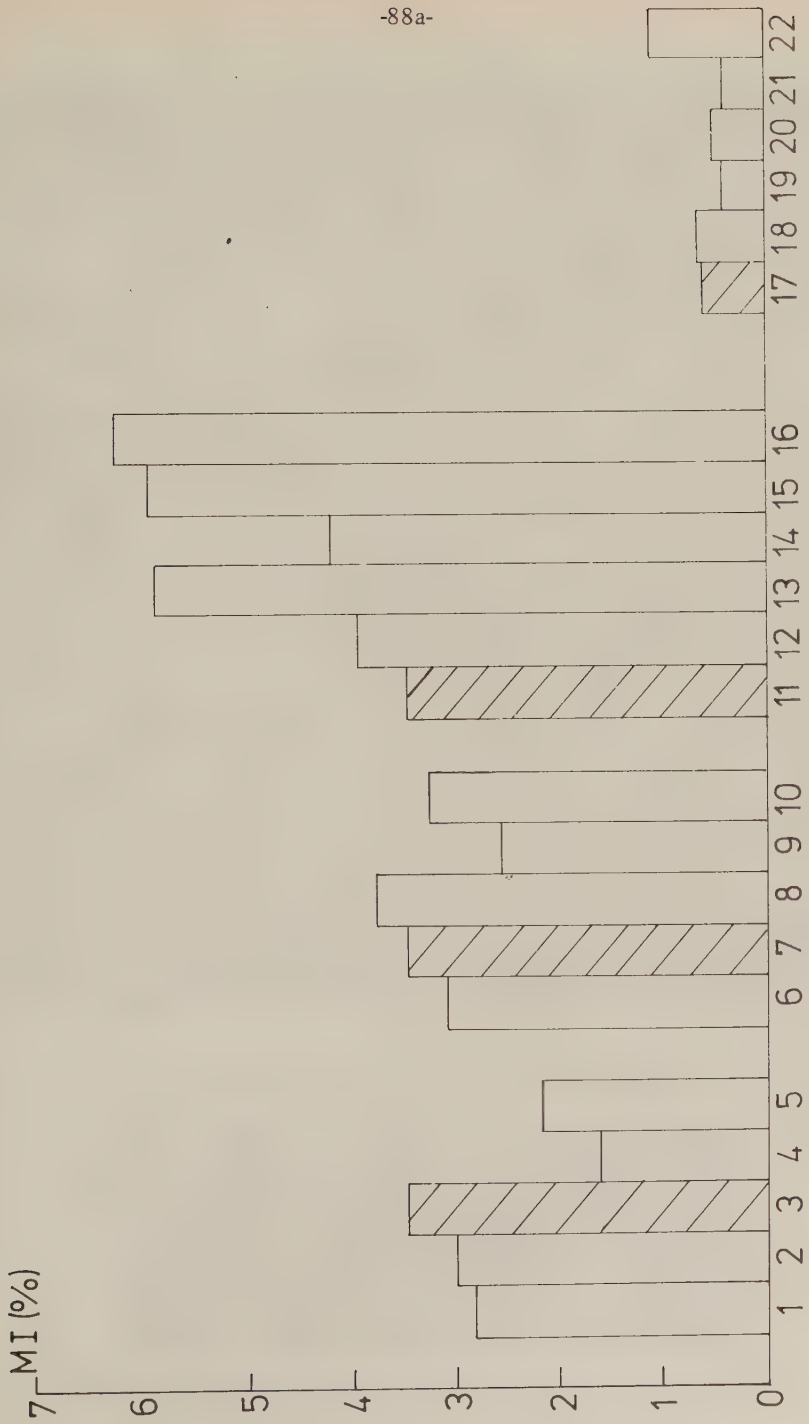
In der TC Medium 199-Kultur streuten die Mitoseindices bei 48 Stunden Kulturdauer nach 4 1/2 stündiger Colcemideinwirkung zwischen 0,4% und 0,9%.

Eine Anreicherung von TC Medium 199 mit Na-Pyruvat, Vitamin B₁₂, ZnSO₄·7H₂O und CuSO₄·5H₂O, sowie mit allen vier Substanzen zusammen, verändert den Mitoseindex der normalen TC Medium 199-Kultur bei 48 Stunden Kulturdauer nicht signifikant.

Abbildung 25:

Mittelwerte der Mitoseindices (%) von Ham's F 10-
Leukozytenkulturen (1-16) und von TC Medium 199 -
Leukozytenkulturen (17-22)

1	-	Phytohämagglutininkonzentration (vol/vol)	0,8%
2			1,6%
3			2,4% = Kontrolle
4			4,8%
5			9,6%
6	-	Serumkonzentration (vol/vol)	5%
7			10% = Kontrolle
8			15%
9			20%
10			25%
11	-	Substanzzugaben zu Ham's F 10	ohne = Kontrolle
12			L-Asparagin
13			L-Arginin
14			L-Glutamin
15			L-Cystein
16			L-Cystein + L-Glutamin
17	-	Substanzzugaben zu TC Medium 199	ohne = Kontrolle
18			Na-Pyruvat
19			Vitamin B ₁₂
20			ZnSO ₄ ·7H ₂ O
21			CuSO ₄ ·5H ₂ O
22			alle 4 Substanzen (18-21) zusammen



CINEMATOGRAPHISCHE ANALYSEN

Eine Filmdokumentation über Phytohämagglutinin-Ham's F 10-Leukozytenkulturen und Pokeweed Mitogen-Ham's F 10-Leukozytenkulturen wird mit dieser Arbeit vorgelegt.

Phytohämagglutinin - Ham's F 10 - Leukozytenkultur:

Phytohämagglutinin-stimulierte Lymphozyten wurden über einen Zeitraum von 22 Minuten nach Kulturansatz bis ca. 194 Stunden Kulturdauer gefilmt (vergl. Filmprotokoll). Von vier der gefilmten Szenen wurden Fotoabzüge angefertigt (Abb. 26 - 29).

Abbildung 26 zeigt einen Lymphozyten umgeben von Erythrozyten, der über eine Zeitspanne von 2 - 28 Stunden Kulturdauer gefilmt wurde. Die Gestalt des Lymphozyten ist oval. Der Zellkern ist deutlich erkennbar.

Abbildung 27: Ein Lymphozyt mit einer ovalen Gestalt, deutlich erkennbarem Kern und Mitochondrien ist von Erythrozyten umgeben. Gefilmt wurde der Lymphozyt zwischen 46 und ca. 53 Stunden Kulturdauer.

Abbildung 28 zeigt einen Lymphozyten, der von 22 Minuten nach Kulturansatz bis 113 Stunden Kulturdauer (fast 5 Tage) gefilmt wurde. Der Lymphozyt hat anfangs eine ovale Gestalt; Kern und Plasmasaum sind deutlich erkennbar. Die ruhende Form geht in eine Bewegungsform über: ein Plasmafortsatz wird zu einem "Fuß", mit dem sich der Lymphozyt am Untergrund festheftet. Mitochondrien treten auf. Der Lymphozyt hangelt sich mit Hilfe von Pseudopodien Erythrozyten heran und umgibt sich damit. Zellmaterial wird abgeschnürt. Am 5. Kulturtag scheint der Lymphozyt zweikernig zu sein. Deutliches Wachstum ist zu verzeichnen: der Durchmesser des Lymphozyten vergrößert sich von $\emptyset 7/6,5$ auf $12,5/5 \mu\text{m}$.

Abbildung 29 zeigt einen Lymphozyten im Bewegungsstadium. Kern und Plasmasaum sind deutlich erkennbar. Der Lymphozyt sitzt mit einem "Plasmafuß" am Untergrund fest. Er bildet dünne Plasmafortsätze aus. Teilweise treten auch breitere Ausstülpungen auf. Es werden sehr viele Mitochondrien ausgebildet, die sich an einem Zellpol ansammeln.



Abbildung 26: 1 Lymphozyt umgeben von Erythrozyten, zwischen 2 und 28 Stunden Kulturdauer gefilmt (Szene 3)

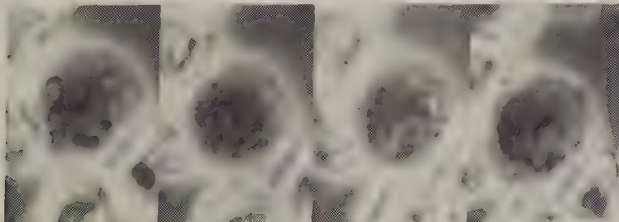


Abbildung 27: 1 Lymphozyt umgeben von Erythrozyten, zwischen 46 und 53 Stunden Kulturdauer aufgenommen (Szene 4)

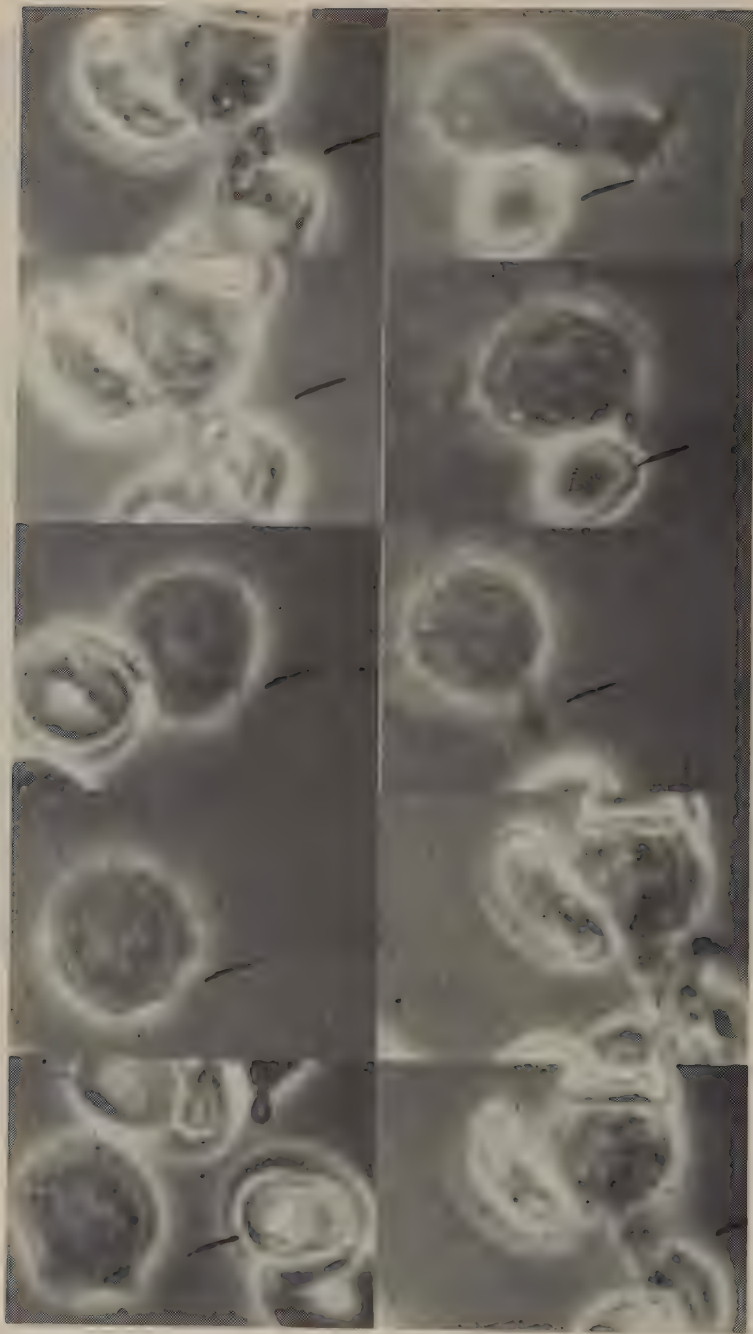
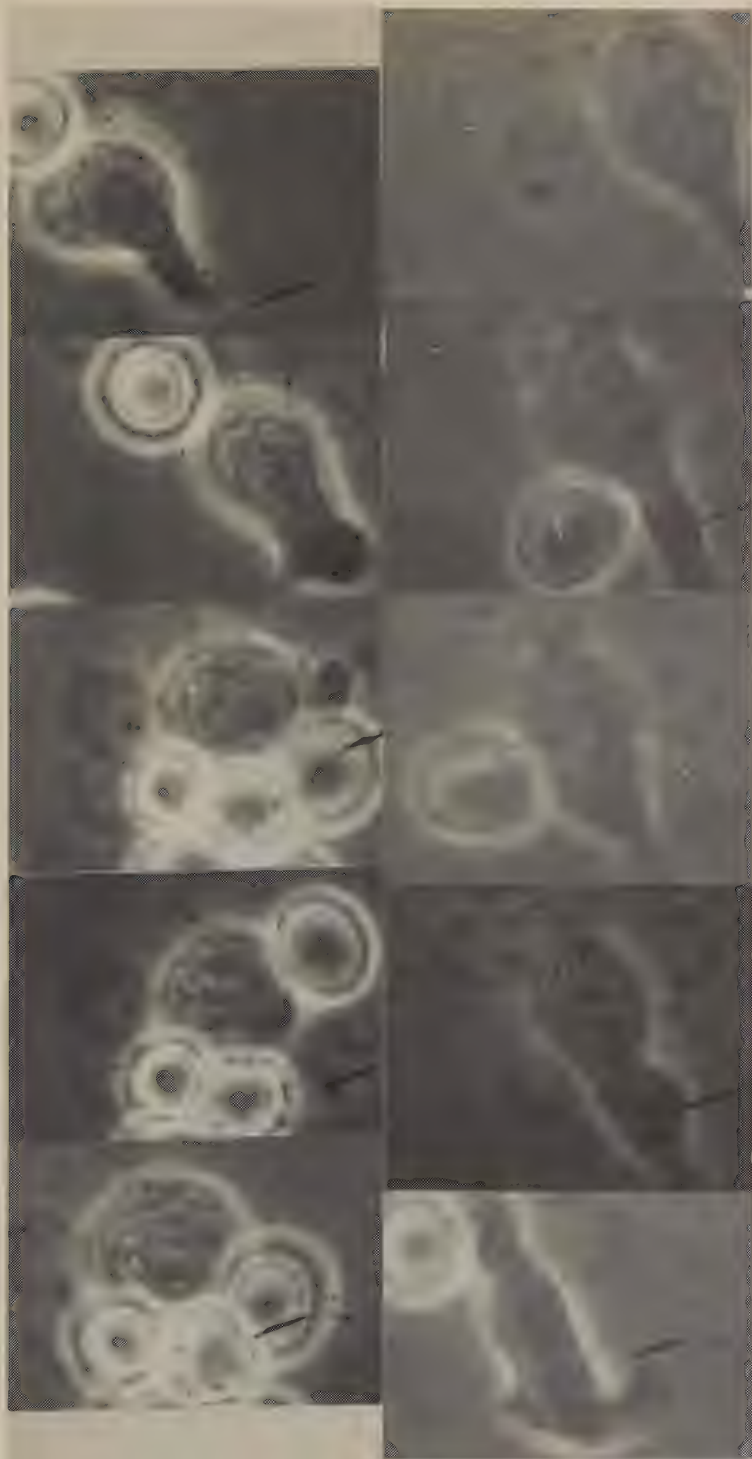


Abbildung 28: 1 stimulierter Lymphozyt aus einer PHA-Kultur, gefilmt zwischen 25 Minuten nach Kulturansatz und 118 Stunden Kulturdauer (Szene 5)

Fortsetzung



Fortsetzung von Abbildung 23

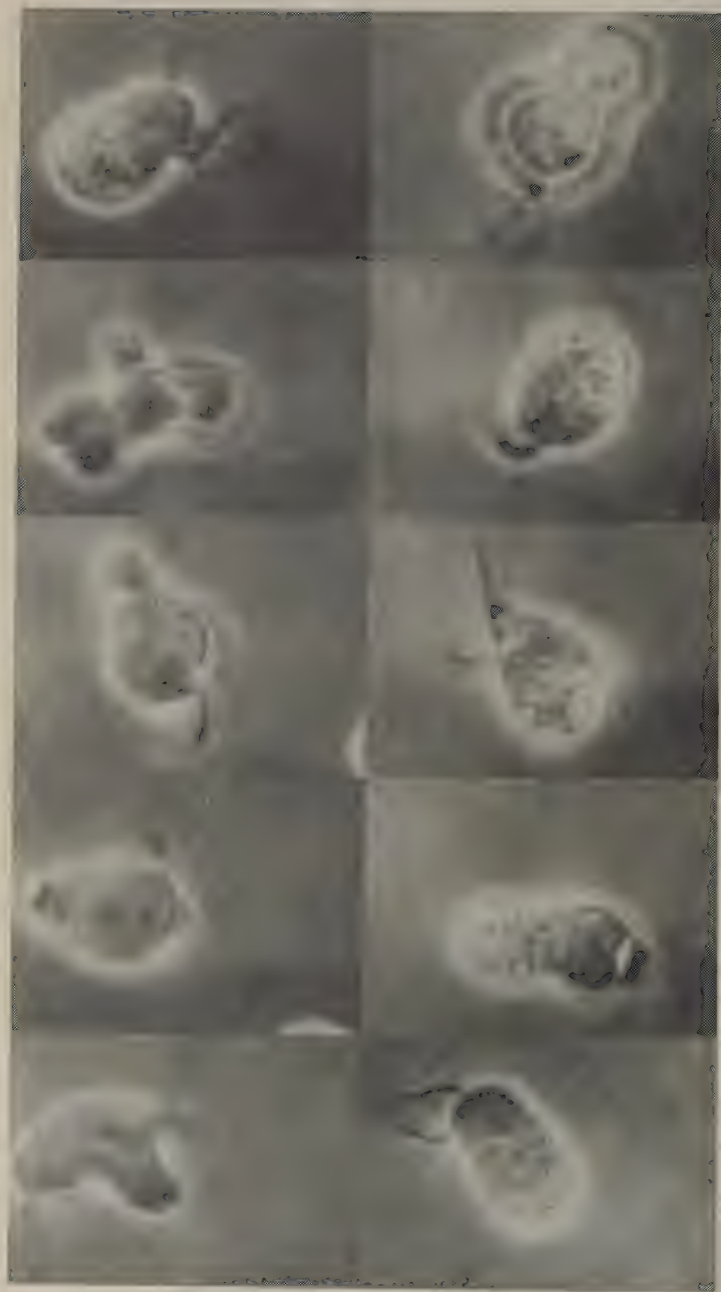


Abbildung 29: Ein stimulierter Lymphozyt, gefilmt ab 27 Minuten nach Kulturanfang
bis ca. 54 Stunden Kulturdauer (Szene 9)

Pokeweed Mitogen - Ham's F 10 - Leukozytenkultur:

Es wurden Lymphozyten aus Pokeweed Mitogen - Kulturen zwischen 16 Minuten nach Kulturansatz und 68 Stunden Kulturdauer gefilmt (vergl. Filmprotokoll). Von drei der gefilmten Szenen wurden Fotoabzüge angefertigt (Abb. 30 - 32).

Abbildung 30 zeigt eine Dreiergruppe von Lymphozyten in engem Zellkontakt. Die Lymphozyten sind anfangs abgerundet und zeigen heftige Bewegung am Ort. Die Kerne sind deutlich erkennbar. Der rechte untere Lymphozyt teilt sich (Mitose). Danach strecken sich die Lymphozyten und lösen sich nach und nach aus dem Zellverbund heraus. Die Lymphozyten schnüren Zellmaterial ab, das am Ende der Szene in der Bildmitte erkennbar wird.

Die Lymphozytengruppe wurde von 24 1/2 Stunden bis 45 Stunden Kulturdauer gefilmt.

Abbildung 31 zeigt einen Lymphozyten mit ovaler Gestalt und einem deutlich erkennbaren Zellkern. Die Zelle drückt sich mit ihrer ganzen Fläche an den Untergrund und schiebt sich gleichsam über die Unterfläche. Der Plasmasaum erscheint fast durchsichtig und bildet sternförmig nach allen Richtungen Pseudopodien aus.

Die Aufnahmen von dieser Zelle wurden zwischen 45 Minuten nach Kulturansatz und 6 Stunden Kulturdauer angefertigt.

Abbildung 32 zeigt einen bewegungslosen Lymphozyten mit einer ovalen Gestalt, der zwischen 22 und 25 Stunden Kulturdauer gefilmt wurde.

Abbildung 30: PWM-stimulierte Lymphozyten, gefilmt von 24 1/2 Stunden bis 45 Stunden Kulturdauer; 1 Mitose (Szene 14)

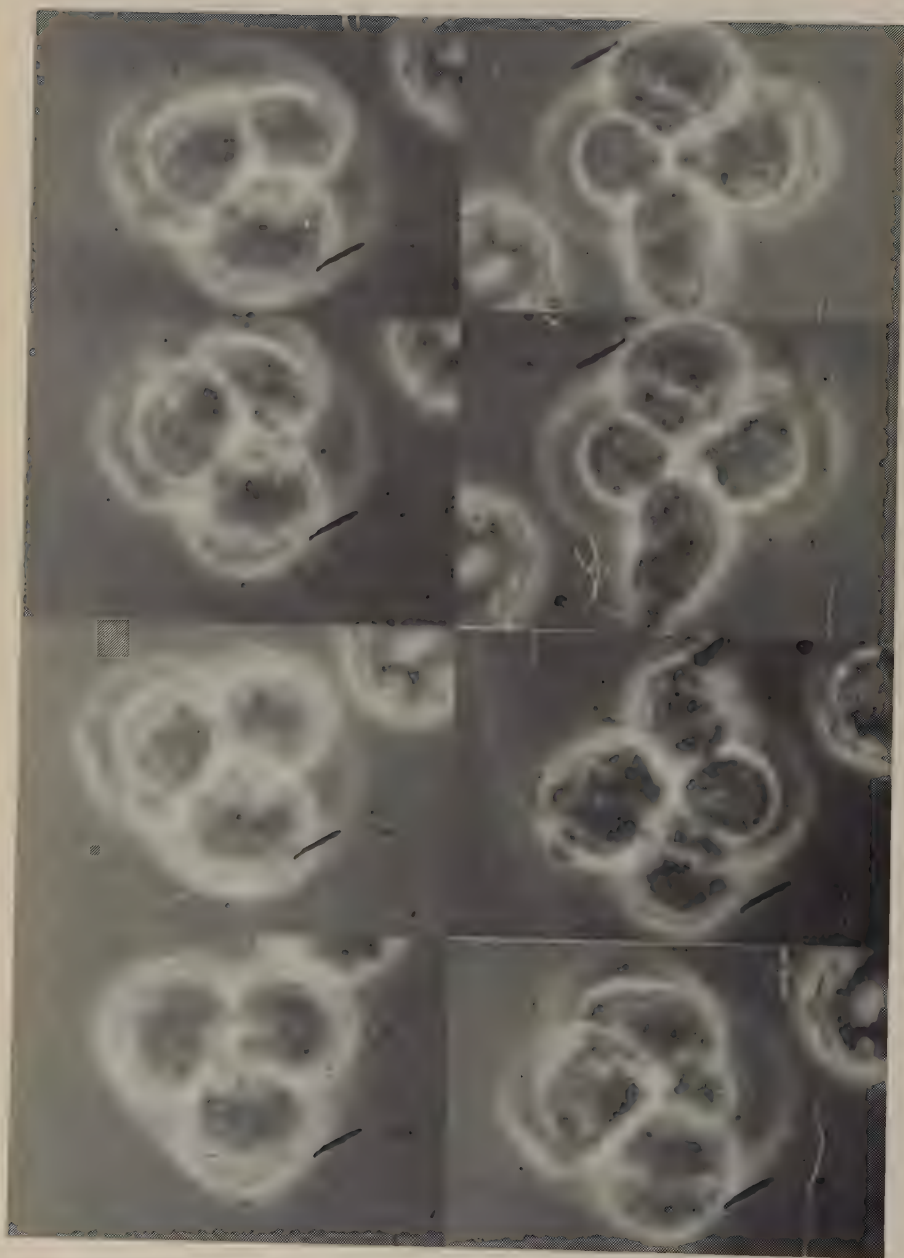


Abbildung 30

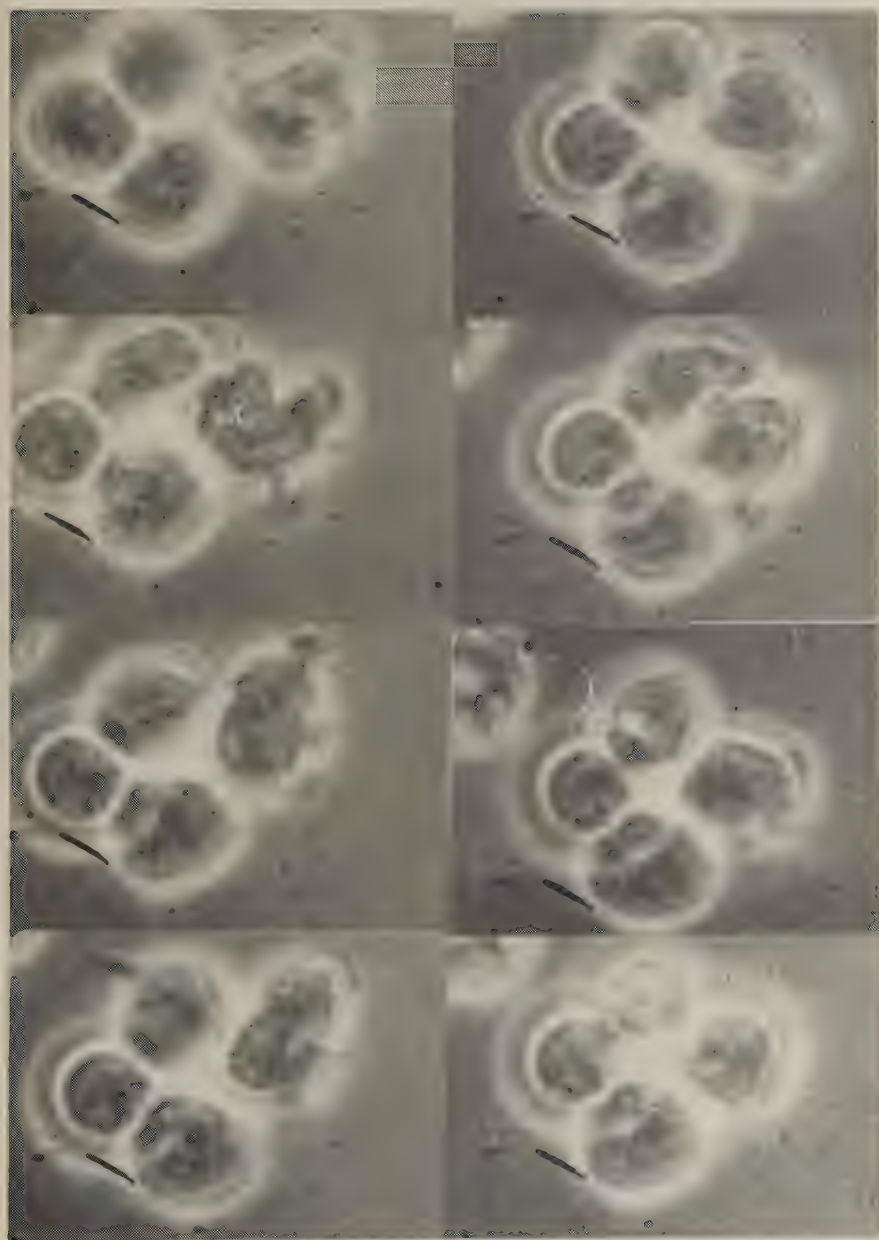


Abbildung 30 - Fortsetzung 1

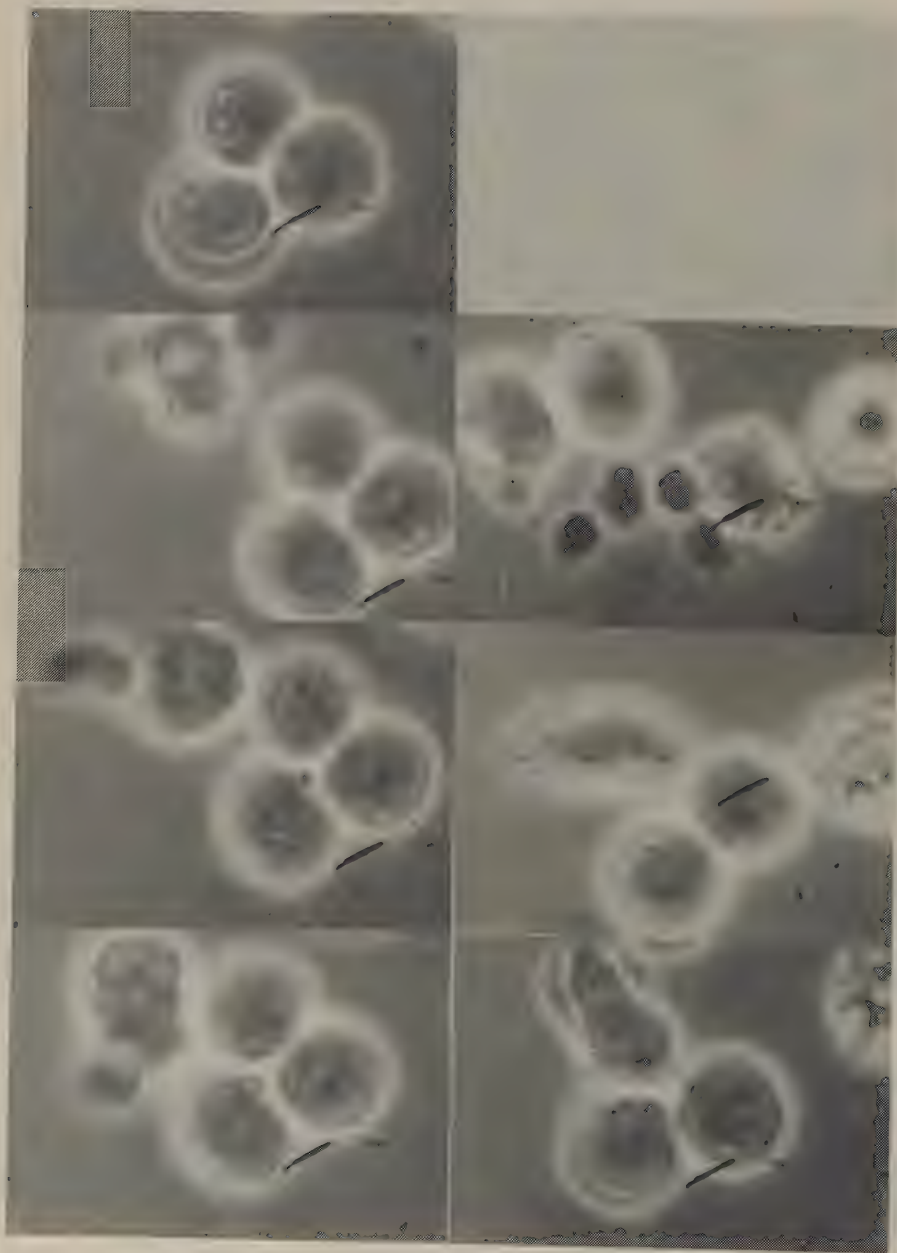


Abbildung 30 - Fortsetzung 2

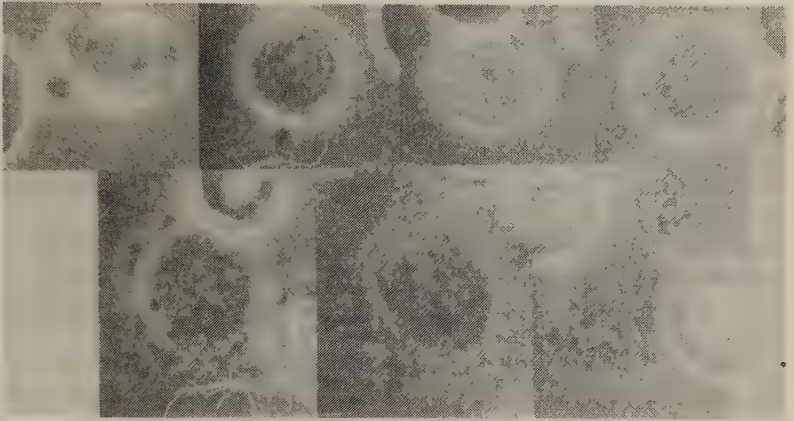


Abbildung 31: Lymphozyt, gefilmt von 45 Minuten nach Kulturansatz
bis 6 Stunden Kulturdauer (Szene 16)

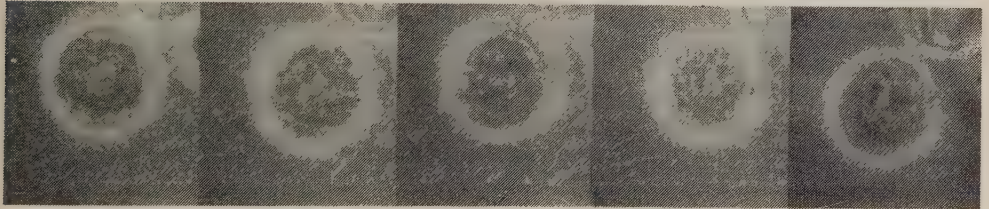


Abbildung 32: Lymphozyt, gefilmt von 22 Stunden bis 25 Stunden
Kulturdauer (Szene 17)

IV. DISKUSSION

Menschliche Leukozyten des peripheren Blutes wurden in Ham's F 10 Medium (HAM, 1963) kultiviert und mit Phytohämagglutinin (PHA) stimuliert.

26 Stunden nach Kulturansatz begannen die kleinen Lymphozyten mit der DNS-Replikation. Erste Mitosen wurden bei 57 Stunden Kulturdauer gefunden.

Wird zur Kultivierung der Leukozyten TC Medium 199 (MORGAN et al., 1950) verwendet, beginnen die ersten Lymphozyten 28 Stunden nach Kulturansatz mit der DNS-Replikation. Erste Mitosen traten in dieser Kultur nach 38 Stunden auf.

LIMA-DE-FARIA et al. (1961) fanden in Leukozytenkulturen mit TC Medium 199 und PHA 30 Stunden nach Kulturansatz tritiummarkierte Zellkerne. BENDER und PRESCOTT (1962) berichten über einen wachsenden Anteil DNS-synthetisierender Zellen im gleichen Kultursystem nach 24 Stunden Kulturdauer, zahlreiche Mitosen traten 42 bis 48 Stunden nach PHA-Zugabe auf. Auch MICHALOWSKI (1963) und SÖREN (1973) lokalisierten den Beginn der DNS-Synthese in diesem Kultursystem nach 24 Stunden Kulturdauer.

JOHANSEN (1972) fand Einbau von radioaktiv markiertem Thymidin nach 24 Stunden und viele Mitosen nach 48 Stunden Kulturdauer, und MAC KINNEY et al. (1962) berichten über erste Mitosen nach einer Kulturdauer von 40 bis 45 Stunden. In diesen beiden Arbeiten werden jedoch keine Angaben über das verwendete Kulturmedium gemacht.

Der Verlauf der DNS-Synthesekurven nach PHA-Stimulierung in Ham's F 10 Medium und in TC Medium 199 ist ähnlich. In TC Medium 199 - Kulturen wurde lediglich eine geringere Rate an markierten Zellkernen bei allen untersuchten Kulturzeiten gefunden: bis 72 Stunden Kulturdauer maximal 24,2% markierte Interphasekerne im Vergleich zur Ham's F 10 - Kultur mit maximal 40,1% markierten Interphasekernen. In der Ham's F 10 - Kultur konnten bei ca. 35 und 40 Stunden Kulturdauer erste Synthesemaxima nachgewiesen werden, die wegen des geringen Zeitabstandes von 5 Stunden nicht von derselben Zellpopulation herrühren dürften. Auch finden sich bis 40 Stunden Kulturdauer nur vereinzelt Mitosen, die Zellen repräsentieren, die zu dieser Zeit ihren Zellzyklus beendet haben. Die Dauer des Zellzyklus für menschliche Lymphozyten wird in der Literatur mit 17 - 25 Stunden angegeben (BIANCHI und DE BIANCHI, 1965; CAVE, 1965; SASAKI

und NORMAN, 1966; SÖREN, 1973). SÖREN (1973) fand eine Verkürzung der Zellzyklusdauer nach der ersten in vitro Zellteilung und führt dies auf eine verkürzte G_1 -Phase zurück.

Über einen biphasischen Verlauf der DNS-Synthese in einer PHA-stimulierten Zwei-Tage-Kultur menschlicher Leukozyten mit Ham's F 10 Medium wurde von unserer Arbeitsgruppe bereits berichtet (DUDIN et al., 1974; SLACIK-ERBEN, 1976). Die Synthesemaxima lagen bei 34 und 40 Stunden (DUDIN et al., 1974), bei 38 und 44 Stunden und bei 36 und 42 Stunden Kulturdauer (SLACIK-ERBEN, 1976). Das Blut stammte von zwei Frauen. In der hier vorliegenden Arbeit wurde das Blut eines Mannes kultiviert. Der biphasische Verlauf der DNS-Synthese ist somit erwartungsgemäß vom Geschlecht des Blutspenders unabhängig.

In der TC Medium 199 - Kultur liegen DNS-Synthesemaxima bei ca. 39 und 44 Stunden Kulturdauer. Der zeitliche Abstand zwischen den beiden Maxima entspricht dem zwischen den Synthesemaxima in der Ham's F 10 - Kultur (etwa 5-6 Stunden).

Die prozentualen und zeitlichen Schwankungen der Ergebnisse in der hier vorliegenden Arbeit zu den früher beschriebenen (DUDIN et al., 1974; SLACIK-ERBEN, 1976) können auf die Verwendung von Blut verschiedener Spender zurückgeführt werden. LOEB et al. (1970) berichten, daß der Beginn der DNS-Synthese und der Anteil DNS-synthetisierender Zellen in Leukozytenkulturen mit Blut von verschiedenen Spendern variieren.

Über einen biphasischen Verlauf der DNS-Synthese in Kulturen mit TC Medium 199 berichtet MICHALOWSKI (1963). Er fand Synthesemaxima bei 60 und 72 Stunden Kulturdauer und Mitosemaxima bei 65 und 77 Stunden. Auch JOHANSEN (1972) stellte einen biphasischen Verlauf der DNS-Synthese in der Leukozytenkultur fest. Zwei Maxima der Mitoseindices fanden STEFFEN und STOLZMANN (1969) nach einem G_1 /S-Block über 70 Stunden in einer Lymphozytenkultur mit TC Medium 199. Die beiden Maxima folgten im Abstand von 6 Stunden aufeinander. Dieser Zeitabstand entspricht dem zwischen den DNS-Synthesemaxima in der vorliegenden Arbeit. JASINSKA et al. (1970) berichten, daß in einer Kultur mit TC Medium 199 die Raten der Zellen, die sich mit fortschreitender Kulturdauer am G_1 /S-Block ansammeln, eine biphasische Kurve ergeben. Diese Daten deuten darauf hin, daß der Verlauf der DNS-Synthese in der PHA-stimulierten Leukozytenkultur auch über längere Kulturzeiten biphasisch bleibt. Dies läßt sich auch aus den Kurven der Abbildungen 1 und 3 ersehen.

ZANK et al. (1972) konnten in Leukozytenkulturen mit Eagle's Medium bei zytophotometrischen Untersuchungen zwei Gipfel im DNS-Karyogramm der Lymphozyten nachweisen. OBE et al. (1976) beschreiben die DNS-Synthesekurve und die Mitoseindices einer Leukozytenkultur mit Eagle's Minimum Essential Medium (MEM) zwischen 23 und 52 Stunden Kulturdauer. Die Autoren schließen aus dem frühen Auftreten von relativ hohen Mitoseraten (bei 27 Stunden etwa 0,5 - 1%), daß die DNS-Synthese bereits vor 23 Stunden Kulturdauer beginnen muß. LOEB et al. (1970) berichten über einen Anstieg im Thymidineinbau im gleichen Kulturmedium bereits 16 bis 18 Stunden nach Kulturbeginn. SALZMAN et al. (1966) stellten in Kulturen mit Eagle's Medium erst nach 24 Stunden Kulturdauer DNS-Syntheseaktivität der Lymphozyten fest.

OBE et al. (1976) vergleichen die Prozentsätze der ersten, zweiten und dritten Mitosen nach 72 Stunden Kulturdauer: mit TC Medium 199 wurden die meisten Mitosen noch in der ersten Zellteilung (24% im Vergleich zu 20% bei Ham's F 10 Medium und 7% bei Eagle's MEM) gefunden, mit Ham's F 10 Medium wurde der größte Prozentsatz an zweiten und mit Eagle's MEM der größte Anteil an dritten Mitosen erhalten.

Diese Ergebnisse lassen vermuten, daß die hier erwähnten Medien eine verlangsamende bzw. beschleunigende Wirkung auf den Stimulierungsprozeß haben, den Verlauf der Transformation an sich jedoch nicht beeinflussen.

Veränderungen der Konzentrationen von foetalem Kälberserum und von Phytohämagglutinin in Leukozytenkulturen mit Ham's F 10 Medium bleiben auf die Mitoseaktivität ohne signifikanten Einfluß (Tabellen 19 und 20).

SALZMAN et al. (1966) fanden bei sehr hohen Konzentrationen von PHA (0,4 ml/ 5 ml Kulturflüssigkeit) eine Senkung der DNS-Syntheserate. In der vorliegenden Arbeit wurden bei hohen PHA-Konzentrationen (0,24 und 0,48 ml / 5 ml Kulturflüssigkeit) auch weniger Mitosen nach 48 Stunden Kulturdauer und 4 1/2 stündiger Colcemideinwirkung gefunden als in der Kontrolle, jedoch ist der Unterschied nicht signifikant. SCHELLEKENS und EIJSVOOGEL (1968) verzeichneten Unterschiede in der DNS-Syntheseaktivität bei verschiedenen Serumkonzentrationen.

In Kulturen mit Ham's F 10 Medium treten nach 48 Stunden Kulturdauer deutlich mehr Mitosen auf ($MI = 3,509\%$) als in Kulturen mit TC Medium

199 ($\overline{MI} = 0,5875\%$). Ham's F 10 Medium enthält Na-Pyruvat, Vitamin B_{12} , $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ und $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, die in TC Medium 199 fehlen. Wird TC Medium 199 mit je einer dieser Substanzen angereichert, ändert sich der Mitoseindex nicht ($\overline{MI}$ zwischen 0,4% und 0,65%). Werden alle Substanzen zugegeben, erhöht sich der Mitoseindex nach 48 Stunden Kulturdauer auf $\overline{MI} = 1,125$; die Abweichung von der Kontrolle ist jedoch nicht signifikant ($P = 0,24$). Auch werden bei weitem nicht die Werte einer Ham's F 10 - Kultur erreicht (vergl. Tabelle 18).

Der Anteil an Aminosäuren in TC Medium 199 ist beträchtlich größer als in Ham's F 10 Medium. Durch Anreicherung von Ham's F 10 Medium mit verschiedenen Aminosäuren wurden die Mitoseindizes nach 48 Stunden Kulturdauer jedoch nicht gesenkt (Tabelle 17).

Der biphasische Verlauf der DNS-Synthese und die zwei Mitosemaxima in PHA-stimulierten Leukozytenkulturen werden von den meisten Autoren mit dem Vorhandensein von zwei Zellpopulationen, die zu unterschiedlichen Zeiten ihre DNS-Synthese beginnen, gedeutet. JASINSKA et al. (1970) wiesen in der Diskussion ihrer Ergebnisse darauf hin, daß in PHA-stimulierten Lymphozytenkulturen von manchen Zellen mitogene Faktoren freigesetzt werden, die in der Lage sind, andere Lymphozyten zu aktivieren. Diese beiden Zelltypen würden daher zu unterschiedlichen Zeiten mit ihrer DNS-Synthese beginnen: Wie in der Einleitung dargestellt, verhalten sich so die T- und B-Lymphozyten. Phytohämagglutinin ist ein T-Zell-Mitogen. Die stimulierten T-Lymphozyten produzieren eine humorale Substanz, die auf die B-Zellen mitogen wirkt (ANDERSSON et al., 1972b; VISCHER, 1972). Hiernach könnte der biphasische Verlauf der DNS-Synthese in der PHA-stimulierten Leukozytenkultur den T- und B-Lymphozyten zugeordnet werden.

Es gibt auch Argumente gegen eine derartige Interpretation. PIGUET und VASSALLI (1972) stimulierten Milzzellkulturen von Mäusechimeren mit PHA, deren Knochenmark nach letaler Bestrahlung mit B-Lymphozyten und Thymozyten unterschiedlicher Chromosomenkonstitution beimpft wurde. Anhand der Chromosomenmarker verfolgten sie das Auftreten der beiden Lymphozytenklassen in den Mitosen. Unter den ausgewerteten Mitosen waren am 2.Tag 78% und am 3.Tag 76% T-Zellen. Die meisten Lymphozyten, die am 3.Tag erstmals mitotisch aktiv waren, waren B-Lymphozyten. Zu diesem Ergebnis führten Versuche, in denen die Lymphozyten durch Vinblastin in ihrer ersten Metaphase gehemmt wurden. Es stammten am 3. Tag nur noch 37% der Mitosen von

T-Lymphozyten. Der erste Schub von B-Zell-Mitosen beginnt somit nach PHA-Stimulierung am 3. Kulturtag. Gewöhnlich teilen sich aber die T-Lymphozyten weiter und verdecken so den Anteil an B-Zell-Mitosen. An den folgenden Kulturtagen überwiegen dann mehr die B-Zell-Mitosen; die T-Zellen stellen ihre Proliferation offenbar ein.

Ergebnisse aus Versuchen an Mäusen können jedoch nicht ohne Einschränkung auf den Menschen übertragen werden. Mit menschlichen Lymphozyten wurden jedoch ähnliche Befunde von LEVIS und ROBBINS (1970) erhoben. Sie reinigten die Lymphozyten aus dem Blut einer Frau und eines Mannes getrennt in Säulenchromatogrammen. Die Lymphozyten der Frau, die die Säule passierten, wurden zusammen mit den in der Säule zurückgehaltenen Zellen des Mannes kultiviert. In den Kulturen traten bei 48 Stunden Kulturdauer nur Mitosen mit dem weiblichen Chromosomensatz auf. Da bei der säulenchromatographischen Reinigung der Lymphozyten bevorzugt B-Lymphozyten in der Säule zurückgehalten werden, stellen die gereinigten Lymphozyten der Frau größtenteils T-Zellen dar (PLOTZ und TALAL, 1967). Bei 48 Stunden Kulturdauer sind nach diesen Befunden nur T-Lymphozyten mitotisch aktiv. SHOHAT et al. (1973) konnten bei elektronenmikroskopischen Untersuchungen zur Morphologie stimulierter Lymphozyten keinen Hinweis auf eine Aktivierung von B-Lymphozyten finden, wenn ein T-Zell-Mitogen zur Stimulierung verwendet wurde.

Nach diesen Befunden sind die beiden DNS-Synthesemaxima in der PHA-Kultur zwei verschiedenen T-Zell-Gruppen zuzuordnen, die unterschiedlich auf PHA reagieren.

Nach immunologischen Kriterien lassen sich die T-Lymphozyten in viele verschiedene Typen unterteilen (BACH und DARDENNE, 1973; OLSSON und CLAEISSON, 1973; KISIELOW et al., 1975; SASAKI et al., 1975). Die unterschiedliche Wirkung von PHA auf verschiedene T-Zell-Gruppen kann mit den Befunden von NASPITZ und RICHTER (1968) und SKOOG et al. (1974) erklärt werden. NASPITZ und RICHTER (1968) fanden eine unterschiedliche Stimulierungsaktivität bei verschiedenen PHA-Konzentrationen. Sie schlossen aus ihren Ergebnissen, daß PHA multiple mitogene Faktoren besitzt. SKOOG et al. (1974) stellten zwei antigene Komponenten bei Phytohämagglutinin fest. Diese verschiedenen Komponenten können auf unterschiedliche T-Zell-Gruppen mitogen wirken.

In Leukozytenkulturen mit Phytohämagglutinin aber verschiedenen Medien ist der DNS-Syntheseverlauf ähnlich. Nach Stimulierung mit verschiedenen Mitogenen sind jedoch deutliche Unterschiede im Verlauf der DNS-Synthese zu verzeichnen:

Nach Stimulation menschlicher Leukozyten mit Concanavalin A (Con A) ist in der Kultur bereits nach 20 Stunden ein deutlicher Einbau von (Methyl-³H)-Thymidin festzustellen. Bis 32 Stunden Kulturdauer treten drei Synthesemaxima auf. Danach bleibt die Syntheseaktivität gering (unter 15% markierte Interphasekerne) bis nach 45 Stunden wieder drei DNS-Synthesemaxima kurz nacheinander erscheinen. Mitosen wurden nach 40 Stunden Kulturdauer gefunden.

Eine hohe DNS-Syntheseaktivität bei 24 Stunden Kulturdauer (in 20% der menschlichen Blutlymphozyten) fanden auch PAULI und STRAUSS (1973) in Con A-stimulierten Leukozytenkulturen. Maximalen Einbau von ³H-Thymidin registrierten diese Autoren zwischen 68 und 74 Stunden Kulturdauer, wenn Con A ständig in der Kultur vorhanden war. Wurde Con A nach 24 Stunden Kulturdauer aus der Kultur entfernt, fanden sie ein DNS-Synthesemaximum zwischen 44 und 50 Stunden. Dieses Maximum erreichte jedoch nicht die Werte, die in Gegenwart von Con A zwischen 68 und 74 Stunden gemessen wurden. Durch das Herauswaschen von Con A aus der Kultur wurde verhindert, daß die Lymphozyten ihre zweite in vitro DNS-Synthese beginnen, da Lymphozyten nach Con A-Stimulation für jede neue Teilungsrunde erneuten Kontakt mit dem Mitogen benötigen (POWELL und LEON, 1970; NOVOGRODSKY und KATCHALSKI, 1971; WEBER et al., 1974).

HEDFORS et al. (1975) markierten menschliche Blutlymphozyten im 4-Stunden-Rhythmus mit ³H-Thymidin. Sie fanden deutlichen Thymidineinbau nach 24 Stunden Kulturdauer. Bis 52 Stunden verzeichneten sie einen steilen Anstieg in der DNS-Syntheseaktivität. Auch POWELL und LEON (1970) fanden DNS-Syntheseaktivität am zweiten Kulturtag in Con A-stimulierten Lymphozytenkulturen und maximalen Thymidineinbau nach drei Kulturtagen.

Werden Leukozytenkulturen mit Pokeweed Mitogen (PWM) stimuliert, beginnen die ersten Lymphozyten 31 Stunden nach Mitogenzugabe ihre DNS zu replizieren. Der Anstieg der Syntheseaktivität bis 74 Stunden Kulturdauer ist unregelmäßig.

FARKER et al. (1973) fanden 24 Stunden nach PWM-Zugabe deutlichen Einbau von ³H-Thymidin in Lymphozyten, die in TC Medium 199 kultiviert

wurden. Der Thymidineinbau wurde mit einem Scintillationszähler gemessen. Auch CHESSIN et al. (1966) berichten über ansteigende DNS-Syntheseaktivität nach 24 Stunden Kulturdauer in PWM-stimulierten Lymphozytenkulturen, die Eagle's Medium enthielten. Die Autoren werteten als markiert alle diejenigen Kerne, die mehr als 3 Silberkörner auf ihrer Oberfläche aufwiesen. In der hier vorliegenden Arbeit wurden in Abbildung 14 die Prozentsätze der Lymphozytenkerne mit mehr als 5 Silberkörnern aufgetragen. 23 Stunden nach PWM-Zugabe treten auch hier regelmäßig Kerne mit mehr als 5 Silberkörnern auf. Maximalen Thymidineinbau registrierten CHESSIN et al. (1966) zwischen 66 und 78 Stunden nach Mitogenzugabe. Die maximale Einbaurrate blieb über mehrere Tage konstant (bis 168 Stunden). Das wird auch durch die Befunde von PARKER et al. (1973) bestätigt.

Mitosen traten in der vorliegenden Arbeit in den PWM-stimulierten Leukozytenkulturen nach 39 Stunden Kulturdauer auf. Es wurden maximal 1,7% Mitosen bei 73 Stunden Kulturdauer gefunden. CHESSIN et al. (1966) fanden 36 Stunden nach PWM-Zugabe die ersten Mitosen. Bei 72 Stunden lag der Mitoseindex bei 2,4%.

In Leukozytenkulturen, die mit Bacto-Lipopolysaccharid (LPS) von *Salmonella typhosa* stimuliert wurden, fanden sich 24 Stunden nach Kulturansatz markierte Interphasekerne. Die Prozentsätze markierter Interphasekerne steigen danach innerhalb einer Stunde (zwischen 26 und 27 Stunden Kulturdauer) in Serie B auf 58% an. Ebensoschnell läßt die DNS-Syntheseaktivität wieder nach: Die DNS-synthetisierende Population sinkt in Serie B nach 3 Stunden (von 27 bis 30 Stunden Kulturdauer) wieder auf Null. Solche extremen Maxima wiederholen sich in Serie B bei 33 und bei 61 Stunden Kulturdauer. Die Prozentsätze markierter Interphasekerne weichen in Serie A zum Teil erheblich von denen in Serie B ab. Dabei ist allerdings der steile Anstieg von einer sehr geringen DNS-Syntheseaktivität zu einer hohen DNS-Syntheseaktivität innerhalb einer Kulturstunde und der ebenso steile Abfall der Aktivität zu berücksichtigen, die bei einer geringen zeitlichen Verschiebung der Parallelserien schon dazu führen könnte, daß die Maxima in einer Serie nicht mehr erfaßt werden können.

Mitosen wurden regelmäßig nach 66 Stunden Kulturdauer gefunden, jedoch maximal nur 4 auf 3000 Zellen.

LPS ist als Mitogen für Mäuselymphozyten oft beschrieben worden:

PEAVY et al. (1971), ANDERSSON et al. (1972c), SCHMIDTKE und DIXON (1972), ADEN und REED (1973), ANDERSSON et al. (1973), COUTINHO und MÖLLER (1973a und b), MELCHERS und ANDERSSON (1973), DOENHOFF et al. (1974), GRONOWICZ und COUTINHO (1974), WATSON et al. (1973a), CHILLER et al. (1973), STEVENS et al. (1975), ASKONAS et al. (1976) und JANOSSY et al. (1976). Lipopolysaccharid stimuliert auch Lymphozyten vom Meerschweinchen, Kaninchen (ELFENBEIN et al., 1973) und von der Regenbogenforelle (ETLINGER et al., 1976).

Die Kinetik der DNS-Synthese in Mäusemilzzellkulturen wurde von STEVENS et al. (1975) beschrieben. ^3H -Thymidin wurde vier Stunden vor Aufarbeitung zur Kultur gegeben, und die Aufarbeitung erfolgte täglich. Die Autoren fanden einen scharfen DNS-Synthesepic bei 24 Stunden Kulturdauer. Die Lymphozyten begannen bereits 6 Stunden nach Kulturansatz ^3H -Thymidin einzubauen. Nach 3 bis 4 Tagen verringerte sich die ^3H -Thymidin-Einbaurrate wieder.

Dagegen fanden COUTINHO und MÖLLER (1973a), MELCHERS und ANDERSSON (1973) und ASKONAS et al. (1976) erst am 2. Kulturtag maximale Stimulierung. STEVENS et al. (1975) fanden eine ähnliche Kinetik der DNS-Synthese wie diese Autoren bei thymuslosen Mäusen.

Über eine stimulierende Wirkung von LPS auf menschliche Blutlymphozyten gibt es widersprüchliche Ergebnisse:

HEDFORS et al. (1976) stimulierten menschliche Lymphozyten mit E.coli-LPS und registrierten eine leichte DNS-Syntheseaktivität. GIRARD und FERNANDES (1974) konnten nach Stimulation mit S.typhosa LPS einen gesteigerten ^3H -Thymidin-Einbau in menschliche Blutlymphozyten feststellen. Die Zugabe des Thymidins erfolgte am 4. Kulturtag, und beendet wurde die Kultur am 5. Tag. Die Autoren fanden eine intensivere Reaktion der Lymphozyten auf Antigene (hier PPD), wenn die Kultur S.typhosa LPS enthielt. Nach Vorbehandlung mit LPS fanden auch SCHMIDTKE und NAJARIAN (1975) eine gesteigerte DNS-Syntheseaktivität der Lymphozyten bei Inkubation mit anderen Antigenen (Con A und PHA). LPS allein war nicht in der Lage, die Lymphozyten zur Proliferation zu aktivieren.

IVANYI (1976) berichtet dagegen über einen suppressiven Effekt von LPS von Veillonella auf die Antigenstimulierung, wenn LPS 24 Stunden nach Kulturansatz zugegeben wurde.

OPPENHEIM und PERRY (1965) fanden Stimulation von menschlichen Blutlymphozyten durch S.typhosa LPS bei Säuuglingen, die einen niedrigen Antikörpertiter gegen Salmonellen im Blut aufwiesen. Nach 5 Tagen

Kultivierung erhielten die Autoren einen Mitoseindex von 1,5% und etwa 6% transformierte Lymphozyten. Eine vierstündige Inkubation der Kultur mit ^3H -Thymidin vor der Aufarbeitung am 5. Kulturtag und anschließende Autoradiographie ergaben, daß 60 - 100% der transformierten Lymphozyten markiert waren.

PEAVY et al. (1970) konnten nur einen ganz geringen Thymidineinbau im Vergleich mit der Kontrolle nach LPS-Stimulierung messen, den sie als nicht signifikant werteten. Das ^3H -Thymidin wurde 24 Stunden vor Aufarbeitung zur Kultur gegeben; die Aufarbeitung erfolgte am 4. Kulturtag. IVANYI und LEHNER (1974) stimulierten menschliche Blutlymphozyten erfolgreich mit LPS von *Veillonella alcalescens*. Die für die Aktivierung optimalen Konzentrationen von LPS lagen 2 - 20mal höher als die für Mäusemilzlymphozyten verwendeten Stimulierungsdosen. GREAVES et al. (1974) stellten bei Inkubation von menschlichen milzlymphozyten mit *E.coli*-LPS leichte, aber signifikante Stimulation fest.

Die Vielfalt der verwendeten Methoden erschwert einen Vergleich mit den in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnissen zur Stimulierung menschlicher Blutlymphozyten durch LPS von *Salmonella typhosa*. Es kann als bewiesen gelten, daß Lipopolysaccharid auf menschliche Lymphozyten aktivierend wirkt. In welchem Ausmaß DNS-Synthese nach LPS-Stimulation erfolgt konnte mit den autoradiographischen Methoden bis jetzt nicht eindeutig bestimmt werden, weil die Spanne zwischen den Aufarbeitungszeiten zu groß gewählt wurde. Die hier vorliegenden Ergebnisse zeigen, daß ^3H -Thymidin nur in sehr eng begrenzten Zeitabschnitten (zwischen 26 und 34 Stunden und bei etwa 62 Stunden Kulturdauer) eingebaut wird. Während der anderen Kulturzeiten erreicht der Anteil markierter Interphasekerne kaum 10%. Die Maxima der DNS-Syntheseaktivität liegen über 25 Stunden auseinander. Bei Inkubation mit ^3H -Thymidin über 4 Stunden und täglicher Aufarbeitung dürfte somit nicht unbedingt die DNS-Syntheseaktivität erfaßt werden.

Die Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit sind demnach mit den Literaturbefunden vergleichbar: Nach Stimulation menschlicher Lymphozyten mit Lipopolysaccharid ist über lange Kulturzeiten nur eine sehr geringe DNS-Syntheseaktivität zu verzeichnen; maximale Stimulation wurde am 2. Kulturtag gefunden.

PEAVY et al. (1970), OPPENHEIM und PERRY (1965) und GREAVES et al. (1974) supplementierten das Kulturmedium mit foetalem Kalberserum (FCS). HEDFORS et al. (1976), GIRARD und FERNANDES (1974) und

SCHMIDTKE und NAJARIAN (1975) verwendeten menschliches Plasma in den Kulturen. Nur OPPENHEIM und PERRY (1965) beschreiben Mitoseaktivität nach LPS-Stimulation.

In Mäuselymphozytenkulturen wird häufig FCS verwendet (ELFENBEIN et al., 1973; WATSON et al., 1973; STEVENS et al., 1975; ASKONAS et al., 1976). SCHÉLLEKENS und EIJSSVOOGEL (1968) konnten bei Supplementierung des Kulturmediums mit FCS ohne Mitogenzugabe nach 6 Tagen einen geringen Thymidineinbau messen. STEVENS et al. (1975) stellten bei unterschiedlichen Serumkonzentrationen der Kontrollkulturen einen Unterschied in der Stärke des Thymidineinbaus fest. ETLINGER et al. (1976) fanden, daß Blutlymphozyten der Regenbogenforelle nur dann auf LPS reagierten, wenn das Kulturmedium mit foetalem Kälberserum angereichert war. Die Autoren schlossen auf eine Wechselwirkung zwischen Serumkomponenten und den mitogen reagierenden Zellen, die zur Aktivierung der Lymphozyten führen kann. ASKONAS et al. (1976) und COUTINHO und MÖLLER (1973a) nehmen mitogene Faktoren in FCS an. In der vorliegenden Arbeit war das Kulturmedium mit 10% FCS supplementiert. Es wäre möglich, daß FCS mitverantwortlich ist für die proliferierende Aktivität der menschlichen Blutlymphozyten nach LPS-Stimulation, wie sie in dieser Arbeit beschrieben wird.

Der Verlauf der DNS-Synthese und der Mitoseindices ist sehr unterschiedlich in Leukozytenkulturen, die mit PHA, Con A, PWM oder LPS stimuliert wurden.

Werden Phytohämagglutinin oder Pokeweed Mitogen als Mitogene verwendet, beginnt die DNS-Synthese in der Leukozytenkultur etwa 30 Stunden nach Kulturansatz. Die DNS-Syntheseaktivität ist maximal bei etwa 70 Stunden Kulturdauer. Mit PHA stimulierte Leukozytenkulturen weisen bei allen Kulturzeiten durchschnittlich zweimal höhere Prozentsätze markierter Interphasekerne auf als PWM-Kulturen.

Werden Leukozytenkulturen mit Concanavalin A oder Lipopolysaccharid stimuliert, ist 20 Stunden nach der Mitogenzugabe bereits eine intensive DNS-Syntheseaktivität zu verzeichnen: bei 30 Stunden in 83% (Con A) und 62% (LPS) der Interphasekerne. Danach läßt die DNS-Syntheseaktivität abrupt nach und steigt später wieder steil an (bei etwa 50 Stunden in Con A-Kulturen und bei 60 Stunden in LPS-Kulturen).

Die Mitoseindices erreichen in Leukozytenkulturen mit PHA und PWM relativ früh hohe Werte: Extremwerte liegen bei etwa 60 Stunden in

PHA-Kulturen mit 2% Mitosen und in PWM-Kulturen mit 1,6% Mitosen. Danach nehmen die Mitosen zunächst ab und treten bei etwa 70 Stunden Kulturdauer wieder gehäuft auf.

Nach Con A-Stimulierung treten erstmals nach 40 Stunden Mitosen auf und nach LPS-Stimulierung erstmals nach 65 Stunden Kulturdauer. Maximal wurden in den Con A-Kulturen 0,4% Mitosen (bei 57 Stunden) und in den LPS-Kulturen 0,13% Mitosen (bei 72 Stunden) gefunden. Die vereinzelt Mitosen in der LPS-Leukozytenkultur bei 33, 42 und 52 Stunden Kulturdauer können als spontane Mitosen gewertet werden, wie sie von BOND et al. (1958) in unstimuliertem menschlichem Blut gefunden wurden.

Das späte Auftreten von Mitosen und die niedrigen Mitoseindices in den Con A- und LPS-stimulierten Kulturen stehen im Widerspruch zur frühen intensiven DNS-Syntheseaktivität in diesen Kulturen.

Die Mitoseraten sind in allen Versuchen niedriger als die Prozentsätze DNS-synthetisierender Zellen. Dafür könnte eine unterschiedliche Dauer des Zellzyklus der einzelnen Zellen verantwortlich sein: BENDER und PRESCOTT (1962) inkubierten Leukozytenkulturen nach 48 Stunden Kulturdauer mit radioaktivem Thymidin. Anhand der Markierungsmuster der Metaphasechromosomen konnten die Autoren zeigen, daß bis 156 Stunden Kulturdauer erste Mitosen auftraten. Den höchsten Prozentsatz an ersten Mitosen fanden sie nach 72 Stunden. Die einzelnen Zellen benötigten von der S-Phase bis zur Mitose somit 24 bis 108 Stunden.

PRICE und TIMSON (1971) fanden, daß sich in Leukozytenkulturen nicht alle transformierten Zellen mitotisch teilen. Die Autoren schließen aus ihren Ergebnissen, daß die DNS-Synthese zwar eine notwendige, aber keine ausreichende Bedingung für eine mitotische Aktivität der Zellen ist.

Eine andere Erklärungsmöglichkeit für die Differenz zwischen den Prozentsätzen DNS-synthetisierender Zellen und den Mitoseindices bieten Arbeiten, die nachweisen, daß Lymphozyten DNS ins Medium abgeben können:

ROGERS et al. (1972) fanden, daß 35 - 90% neusynthetisierte DNS, die über 4 Stunden am 3. Kulturtag radioaktiv markiert wurde, nach 3 weiteren Tagen ins Medium ausgeschieden wurde. Die DNS-Eksekretion ging unter Bedingungen, die aktives Zellwachstum erlaubten, vonstatten. Die ausgeschiedene DNS stammte nicht von toten Zellen; die DNS im Medium bestand aus kleinen Doppelstrangmolekülen von durchschnittlich 2 - 8S und einem Gehalt von 35% G + C. DNS des Zell-

kerns setzt sich zu 42,2% aus G + C zusammen (ROGERS, 1976). Auch ANKER et al. (1975, 1976) wiesen nach, daß menschliche Blut-lymphozyten komplexe, doppelsträngige DNS ins Medium abgeben. Dabei wird eine bestimmte DNS-Konzentration im Medium nicht überschritten. Wird das Medium entfernt und durch frisches ersetzt, ist die gleiche Konzentration an extrazellulärer DNS etwa nach einer Stunde wieder hergestellt. Die Autoren schließen auf einen "homöostatischen Mechanismus", der die DNS-Ausscheidung kontrolliert.

DNS-Exkretion wurde bei unstimulierten Lymphozyten nachgewiesen (ANKER et al., 1975 und 1976) sowie bei Lymphozyten, die mit PHA (SARMA und RUTHMAN, 1972; SARMA und ZUBROFF, 1973; ROGERS, 1976), Con A, PWM (ROGERS et al., 1972; OLSEN und HARRIS, 1974) und LPS (FUNDERBURGH et al., 1974) stimuliert wurden.

ROGERS et al. (1972) und SARMA und ZUBROFF (1973) bieten folgende Erklärungsmöglichkeiten für die DNS-Exkretion der Lymphozyten an:

1. Diesen Zellen fehlt eine Substanz im Medium, die sie für eine mitotische Aktivität benötigen. Sie scheiden deshalb die neu-synthetisierte DNS aus und gehen wieder in den Ruhezustand über.
2. Die DNS erfüllt in der Zelle noch nicht definierte Funktionen und wird danach ausgeschieden.
3. DNS wird als eine Botschaft für einen noch unbekannten Empfänger ausgeschieden.
4. DNS-Fragmente werden infolge aktiver Repairprozesse ausgeschieden.

Für die erste Erklärungsmöglichkeit sprechen die Befunde von POLGAR et al. (1968) und POLGAR und KIBRICK (1970). In beiden Arbeiten wird berichtet, daß transformierte Lymphozyten in PHA-Kulturen nach 7 Tagen Kultivierung wieder zu kleinen Lymphozyten werden. Diese Zellen würden ihre neusynthetisierte DNS ins Medium ausscheiden bevor sie wieder in den Ruhezustand übergehen.

LERNER et al. (1971) beschreiben eine DNS in menschlichen Lymphozyten, die mit der Plasmamembran assoziiert ist. Diese DNS unterscheidet sich von der Kern- und Mitochondrien-DNS durch verschiedene physikalische Eigenschaften und den Zeitpunkt im Zellzyklus, zu dem sie synthetisiert wird: nämlich vorwiegend in der G₁-Phase. Die Autoren nehmen an, daß eine Verbindung zwischen dem Ig-Rezeptor in der Plasmamembran und dem Antigen zu einer Konformationsänderung der Membran führt, die es der Membran-DNS erlaubt entweder repliziert oder transkribiert zu werden. Replikation könnte zu Genamplifikation führen, Transkription zur Synthese von Regulatorpolypeptiden.

Auch HALL et al. (1971) beschrieben eine membranassoziierte DNS und wiesen nach, daß diese DNS im Kern synthetisiert und dann zur Plasmamembran transportiert wird. Die Membran-DNS ist ein stabiles Molekül und ist nicht auf DNS toter Zellen zurückzuführen, die mit der Zellmembran lebender Zellen assoziiert ist.

FUNDERBURGH et al. (1974) wiesen in Mäusemilzzellkulturen nach LPS-Stimulierung eine zellfreie DNS nach, die mit Kern-DNS hybridisiert und nicht in unstimulierten Lymphozyten gebildet wird.

SARMA und RUTHMAN (1972) inkubierten Lymphozyten 30 Minuten lang mit ^3H -Thymin und ließen sie dann in Medium mit unmarkiertem Thymin weitere 5 - 10 Stunden wachsen. Die Radioaktivität wiesen die Autoren nach dieser Zeit in kleinen DNS-Fragmenten nach. Wachsen die Zellen über längere Zeit in ^3H -Thymin-haltigem Medium, so wurden innerhalb von 5 Stunden 30% und nach 25 Stunden 70% der neu-synthetisierten DNS fragmentiert und ins Medium ausgeschieden. DNS-Exkretion tritt nicht nur in Lymphozytenkulturen auf: CHURCH und CONSIGLI (1971) fanden DNS-Fragmentation und -Ausscheidung in Kulturen von Schleimhauttumorzellen der Ratte. Die Autoren glauben, daß damit aktive Repairprozesse in diesen Zellen zusammenhängen.

COOPER und MILTON (1964) fanden, daß menschliche Lymphozyten Thymin aus dem Medium zu Thymin und Dihydrothymin, die nicht bei der DNS-Synthese verwendet werden, abbauen. Diese Reaktion ist unabhängig von der Anzahl DNS-synthetisierender Zellen. Sehr aktiv bauen auch die polymorphkernigen Leukozyten Thymin aus dem Medium ab (HARTOG et al., 1967).

Es gibt auch einige Hinweise dafür, daß DNS als Messenger fungieren kann:

PELC et al. (1972) verfolgten den Einbau von ^3H -Thymin in Zellen der Mäusemilz nach Antigenstimulierung in vivo. Sie schlossen aus ihren Befunden auf die Existenz metabolischer DNS, die eine entscheidende Rolle in dem Prozeß spielt, der zur Antikörpersynthese führt. Es scheint eine Verbindung zwischen der Proteinsynthese und dem DNS-Turnover in verschiedenen Zelltypen zu bestehen. Die Autoren diskutieren die Möglichkeit, daß die Zellen, die sich zu antikörperproduzierenden Plasmazellen entwickeln, DNS von antigen-sensitiven Zellen erhalten. Diese DNS müßte eine spezifische Basensequenz haben: die notwendige Information für die Antikörperspezifität. Die Wirtszelle würde nun diese DNS in ihr Genom einbauen oder sie als Template für die Transkription verwenden. BURNET (1973) berichtet, daß bei Pneumokokken Information von einer Zelle zur anderen über DNS-

Fragmente übertragen wird, die in das Empfänger-Genom reinkorporiert werden. OLSEN und HARRIS (1974) wiesen nach, daß Con A-stimulierte Lymphozyten des Menschen, die aktiv DNS synthetisieren, Bakterien-DNS (von *M. lysodeicticus*) aufnehmen und sie in ihre Kern-DNS einbauen. Die eingebaute Bakterien-DNS kann 5 - 6% der endogenen DNS betragen. PEGRUM et al. (1972) konnten mit Kernmaterial von PHA-stimulierten Lymphozyten unstimulierte Lymphozyten aktivieren. Dagegen wurden die DNS- und RNS-Synthese in PHA-stimulierten Lymphozyten durch Chromatinmaterial von isologen unstimulierten Lymphozyten gehemmt (PEGRUM und THOMPSON, 1971).

Als Zeichen einer Funktion der DNS bei der Wechselwirkung zwischen Zellen deuteten POLITIS et al. (1975) den Transfer von Lymphozyten-DNS aus PHA-Kulturen auf Schäferythrozyten beim Agglutinationstest. Diese Interpretation würde auch eine Erklärung für die Markierung polymorphkerniger Leukozyten nach Con A- und LPS-Stimulierung in der vorliegenden Arbeit liefern. Über eine Wechselwirkung zwischen polymorphkernigen Leukozyten und Lymphozyten berichten mehrere Autoren: COOPER et al. (1962) wiesen darauf hin, daß in PHA-stimulierten Leukozytenkulturen aktiv sich teilende mononukleäre Zellen geringe Mengen an alkalischer Phosphatase im Zellkern aufweisen. Alkalische Phosphatase tritt in geringen Mengen in neutrophilen Polymorphkernigen auf. Diese sterben mit zunehmender Kulturdauer ab, wodurch ihre Granula ins Medium gelangen.

HAMBLIN et al. (1976a, 1976b) fanden, daß Leukozytendialysate die Reaktion von antigen-sensitiven Zellen auf Mitogene in vitro erleichtern. Die Autoren nahmen an, daß die dafür verantwortlichen Faktoren von Makrophagen oder Polymorphkernigen stammen. Über Faktoren in den Lysosomen der polymorphkernigen Leukozyten, die mitogen auf Lymphozyten wirken, berichten CHORZEWICKI et al. (1973). Die Autoren schreiben den polymorphkernigen Leukozyten eine bedeutende Rolle bei der Transformation der Lymphozyten zu.

Die Prozentsätze polymorphkerniger Leukozyten bei verschiedenen Kulturzeiten in Con A- und LPS-Kulturen deuten ebenfalls auf eine Wirkung des Mitogens auf die Polymorphkernigen hin (Abbildungen 12 und 21). Es ist keine stetige Abnahme der polymorphkernigen Leukozyten mit zunehmender Kulturdauer zu verzeichnen, was nach allmählichem Absterben dieser Zellen in der Kultur - wie von COOPER et al. (1962) berichtet wird - zu erwarten wäre. Die Schwankungen der Prozentsätze Polymorphkerniger sind unterschiedlich bei verschiedenen Mitogenen und ergeben für jedes Mitogen ein charakteristisches

Kurvenbild. Diese Befunde können mit Verhaltensänderungen der Polymorphkernigen während der Kultivierung gedeutet werden. CLINE und GOLDE (1974) fanden, daß Lymphozyten nach Stimulation mit PHA oder PWM die Bildung von Kolonien aus Granulozyten und mononukleären Zellen des menschlichen Knochenmarks in vitro veranlassen. Es ist möglich, daß die polymorphkernigen Leukozyten auf Grund ihrer Fähigkeit zu agglutinieren nicht gleichmäßig in allen Proben erfaßt werden. Die Charakteristik, nach der die Polymorphkernigen in den Kulturproben auftreten oder fehlen, deutet auf einen aktiven Prozeß hin. Möglicherweise haften diese Zellen manchmal fest an der Glaswand des Kulturgefäßes. Die Eigenschaft von Leukozyten an Glas zu haften wird bei der Leukozytentrennung ausgenutzt (LEVIS und ROBBINS, 1970; SENDA et al., 1975).

Der Prozeß, der die Markierung der Polymorphkernigen in Con A- und LPS-Kulturen bewirkt, scheint auch zu Markierung unstimulierter Lymphozyten zu führen. In der vorliegenden Arbeit wurde in Con A- und LPS-stimulierten Kulturen ein beträchtlicher Anteil Zellkerne gefunden, die zwischen 5 und 20 Silberkörner Markierung aufzeigten und das Aussehen von Kernen unstimulierter kleiner Lymphozyten hatten. Die Prozentsätze Interphasekerne mit 5 - 20 Silberkörnern Markierung waren in den PHA-(DUDIN, 1974) und PWM-Leukozytenkulturen (vergl. Abb. 13 und 14) vernachlässigbar gering und veränderten den Verlauf der DNS-Synthesekurve nicht. Werden jedoch nach Con A- und LPS-Stimulation die Prozentsätze markierter unstimulierter Lymphozytenkerne und die Prozentsätze markierter Interphasekerne addiert und über den Kulturdauer aufgetragen, entsteht eine völlig veränderte DNS-Synthesekurve.

Zellen mit dem Aussehen unstimulierter Lymphozyten, d.h. einem kleinen, stark heterochromatischen Kern wiesen DOUGLAS et al. (1967), JANOSSY et al. (1973) und SHOHAT et al. (1973) in PWM- und LPS-stimulierten Leukozytenkulturen nach. Diese Lymphozyten werden zu Plasmazellen, die Immunglobulinmoleküle segregieren. Es ist jedoch nicht anzunehmen, daß in Con A-Kulturen - Con A ist ein T-Zell-Mitogen - bereits nach 20 Stunden Kulturdauer B-Lymphozyten ihre DNS replizieren. Dagegen sprechen auch die Befunde von JANOSSY et al. (1973), die in Con A-stimulierten Kulturen keine Plasmazellen nachweisen konnten.

Die Kurvenbilder aus den Prozentsätzen markierter Polymorphkerniger in Abhängigkeit von der Kulturdauer (Abb. 10 und 20) und aus den Prozentsätzen markierter Lymphozytenkerne mit mehr als 5 Silber-

körnern (Abb. 9 und 18) sind auffallend ähnlich. Die Kurven sind fast deckungsgleich. Dies könnte darauf hindeuten, daß derselbe Mechanismus zur Markierung der polymorphkernigen Leukozyten und der kleinen, unstimulierten Lymphozyten führt.

Nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit und nach den Befunden in der Literatur kann angenommen werden, daß nach Con A- und LPS-Stimulation die Fähigkeit von Lymphozyten, DNS außerhalb der eigentlichen DNS-Replikations-Phase (S-Phase) zu synthetisieren, stimuliert wird oder/und ihre Fähigkeit, DNS-Vorstufen aufzunehmen und abzubauen.

Wie in der Einleitung beschrieben sind Concanavalin A und Phytohämagglutinin T-Zell-Mitogene. Pokeweed Mitogen stimuliert T- und B-Lymphozyten und Lipopolysaccharid nur B-Lymphozyten.

Demnach wäre nach PWM-Stimulation im Vergleich zu den übrigen Stimulanzen die größte Ausbeute an DNS-synthetisierenden Zellen und Mitosen in einer 2-Tage-Kultur der Lymphozyten zu erwarten; das ist jedoch nicht der Fall. In den PHA-stimulierten Leukozytenkulturen liegen die Prozentsätze markierter Interphasekerne bei allen Kulturzeiten um den Faktor zwei höher als in PWM-Kulturen.

PHA und Con A stimulieren einen großen Anteil der T-Lymphozyten. Der Verlauf der DNS-Synthese ist jedoch völlig verschieden bei den beiden Mitogenen. Es wurde bereits darauf hingewiesen, daß schon die Primärvorgänge beim Stimulierungsprozeß durch diese beiden Phytomitogene unterschiedlich sind. Con A bindet doppelt so viele Oberflächenproteine wie PHA, und zur erfolgreichen Stimulation durch Con A benötigen die Lymphozyten einen längeren Kontakt mit dem Mitogen als nach PHA-Stimulation. Ferner wurde erwähnt, daß PHA, Con A und PWM verschiedene, aber sich überlappende Spektren von Saccharidspezifität besitzen.

Die T-Zell-Spezifität von PHA und Con A führt also nicht unbedingt zu einer identischen Reaktion der Lymphozyten auf beide Mitogene. Es gibt mehrere Beweise dafür, daß die Lymphozyten, die auf PHA reagieren, nicht identisch sind mit denen, die auf Con A reagieren (BOLDT et al., 1972; GERY et al., 1972; PAULI und STRAUSS, 1973; STORO und PAUL, 1973; SCHMIDTKE und AJARIAN, 1975). BOLDT et al. (1972) trennten menschliche periphere Blutlymphozyten mit einer Nylo Säule. Die Lymphozyten, die an den Nylonfäden haften, reagieren sehr heftig auf Con A, während die Zellen, die die Säule passieren, fast nicht von Con A stimuliert werden. Beide Populationen reagieren fast gleich

auf PHA und PWM. Alle Lymphozyten haben die gleiche Affinität zu Con A, jedoch besitzen die Lymphozyten, die die Säule passieren, dreimal weniger Con A-Rezeptorsites als ungereinigte Lymphozyten.

Con A liegt bei neutralem pH zum Teil als Dimer und zum Teil als Tetramer vor. SAWYER et al. (1975) fanden keinen Unterschied in der DNS-Syntheseaktivität, je nachdem ob Dimere oder Tetramere die Zellen stimulierten.

PAULI und STRAUSS (1973) kultivierten menschliche Lymphozyten mit Con A. Nach der ersten Teilungsrunde stimulierten sie diese Zellen mit PHA oder PWM zur weiteren Proliferation. 94% der Con A-stimulierten Zellen, die radioaktiv markiert waren, reagierten auf PHA und 85% auf PWM. Das bedeutet, daß der größte Teil der Lymphozyten, die auf Con A reagieren, auch durch PHA oder PWM stimuliert werden können. Die Autoren fanden, daß in den Kontrollkulturen anfangs weniger Zellen nach PWM-Stimulation mit der DNS-Synthese begannen als nach Con A-Stimulation (13% : 20%), jedoch kehrte sich das Verhältnis bald um.

Libopolysaccharid ist als B-Zell-Mitogen bekannt. BLITSTEIN-WILLINGER et al. (1976) zeigten, daß LPS von E.Coli nicht synergistisch mit PHA bei der Stimulierung von Mäusethymozyten wirkt. SCHMIDTKE und NAJARIAN (1975) konnten eine höhere DNS-Syntheseaktivität in Kulturen menschlicher Blutlymphozyten, die mit PHA (bzw. Con A) und LPS stimuliert wurden, messen als in Kulturen, die nur mit PHA oder Con A stimuliert wurden.

Eine Wirkung von LPS auf T-Lymphozyten ist nicht auszuschließen: IVANYI (1976) fand eine reduzierte DNS-Syntheseaktivität in T-Lymphozytenkulturen, wenn die Zellen 24 Stunden vor Antigenzugabe mit LPS inkubiert wurden, im Vergleich zu den Kontrollkulturen.

Werden verschiedene B-Zell-Mitogene (z.B. Polyanione, wie Dextran sulfat = DS oder doppelsträngige Homopolyribonukleinsäure) mit LPS zusammen zur Stimulation von B-Lymphozyten verwendet, wird ein additiver Effekt bezüglich der DNS-Syntheseaktivität der Kontrollkulturen erreicht (DIAMANTSTEIN et al., 1974). DIAMANTSTEIN et al. (1974) schlossen daraus, daß verschiedene Gruppen von B-Lymphozyten von diesen Antigenen stimuliert werden.

Die Kinetik der Zellproliferation in Leukozytenkulturen nach Stimulation mit PHA, Con A oder PWM verdeutlicht ein Vergleich der Prozentsätze erster und weiterer Mitosen nach 72 Stunden Kultur-

dauer und 4 1/2 stündiger Colcemidbehandlung:

Mitogen	1. Mitosen	weitere Mitosen
PWM	80%	20%
Con A	33%	67% (36% 2. und 31% 3. Mitosen)
PHA	20%	80% (57% 2. und 23% 3. Mitosen)

Die Daten stammen für Con A aus der vorliegenden Arbeit, für PWM von DUDIN et al. (1976) und für PHA von OBE et al. (1976).

Der Vergleich zeigt, daß PHA- und Con A-stimulierte Lymphozyten schneller proliferieren als PWM-stimulierte Lymphozyten. Nach PWM-Stimulation ist das Verhältnis von ersten Mitosen zu weiteren Mitosen umgekehrt wie nach PHA-Stimulation.

Wie aus Abbildung 13 hervorgeht, beginnen die PWM-stimulierten Lymphozyten sehr asynchron mit der DNS-Synthese. Die Zellzyklusdauer scheint bei den mit verschiedenen Mitogenen stimulierten Lymphozyten unterschiedlich zu sein: In der Con A-stimulierten Leukozytenkultur treten nach 40 Stunden Kulturdauer erste Mitosen auf, in der PHA-stimulierten Kultur nach 36 Stunden; jedoch wurde in der Con A-Kultur der höchste Prozentsatz dritter Mitosen nach 72 Stunden Kulturdauer gefunden. Der Anteil der zweiten und weiteren Mitosen insgesamt war aber in der PHA-Kultur am größten.

In den DNS-Synthesekurven von PHA-stimulierten Leukozytenkulturen tritt unter dem Einfluß von Bleiacetat (PbAc) eine Aufspaltung der einzelnen Synthesemaxima in zwei Submaxima auf (Abb. 27 und 24). Eine Aufspaltung der DNS-Synthesemaxima in Submaxima wurde mit Kulturen von Zellen des Wurzelspitzenmeristems von *Vicia faba* nach Behandlung der Zellen mit Röntgenstrahlen, Maleinsäurehydrazid (SCOTT, 1968), mit Stickstofflost (EVANS und SCOTT, 1969) und mit Tepa (STURELID, 1971) nachgewiesen.

Der Einfluß von Bleiacetat auf die DNS-Synthese könnte auf einer direkten Wirkung von Blei auf die DNS beruhen. Bleiacetat könnte aber die Veränderungen im DNS-Syntheseverlauf auch indirekt durch Beeinflussung der DNS-Polymerase hervorrufen, wie sie für andere Metalle (Li, Na und Mg) nachgewiesen wurde (BISHOP und GILL, 1971), oder über eine Beeinflussung des Energiemetabolismus infolge einer Schädigung der Mitochondrien (KOEPE und MILLER, 1970; CARDONA et al., 1971). Blei konkurriert mit intrazellulärem Eisen, das für die DNS-

Synthese notwendig ist (ROBBINS und PEDERSON, 1970; ROBBINS et al., 1972).

KRIGMAN et al. (1968) berichten über eine gesteigerte DNase-Aktivität im Urin von bleibehandelten Ratten. CHOIE und RICHTER (1972a; 1972b) fanden einen Einfluß von Blei auf die Proliferation der Zellen in der Rattenniere.

FILMBESPRECHUNG:

Es wurden mit PHA und PWM stimulierte Lymphozyten zu verschiedenen Kulturzeiten gefilmt. Dabei konnte eine Mitose in einer PWM-Kultur nach ca. 40 Stunden Kulturdauer erfaßt werden. In einer Dreiergruppe von Lymphozyten teilt sich eine Zelle. HÜLSER und PETERS (1972), PETERS (1972) und PETERS (mündliche Mitteilung) berichten über Zellkontakt als notwendige Voraussetzung für die Stimulierung von Lymphozyten durch Mitogene. Es ist anzunehmen, daß die einzeln liegenden transformierten Lymphozyten deshalb nicht in Mitose gehen - es wurden transformierte Zellen bis zum 8. Kulturtag gefilmt -, weil sie keinen Kontakt mit anderen Lymphozyten hatten. Zellkontakt wäre also über alle Kulturzeiten notwendig und Isolierung während der Kultivierung würde die Zellen in der Proliferation hemmen. Darauf deuten die Filmergebnisse hin: Es wurden Blutkulturen angesetzt und im Brutschrank kultiviert. Von diesen Kulturen wurden bei verschiedenen Kulturzeiten Objektträgerkulturen angefertigt. Es kann vorausgesetzt werden, daß die Zellen in der ursprünglichen Kultur Zellkontakt hatten, da die Lymphozytenkonzentration erheblich höher war als in den Objektträgerkulturen. Auch zeigen die gefilmten Lymphozyten deutliche Zeichen stimulierter Lymphozyten, wie vermehrtes Plasma, Mitochondrien und Nukleoli. Die gefilmte Mitose trat in einer Objektträgerkultur auf, die nach 24 Stunden Kulturdauer aus Kulturflüssigkeit einer Glaskultur angesetzt wurde. Der Zellkontakt zwischen der Dreiergruppe der Lymphozyten war zu diesem Zeitpunkt schon hergestellt.

LEWIS (1931) beschreibt die Bewegung unstimulierter kleiner Lymphozyten als amöbenähnlich. MARSHALL und ROBERTS (1965) filmten die Transformation kleiner Lymphozyten in einer PHA-Leukozytenkultur. Die Autoren zeigten, daß die Bewegung kleiner Lymphozyten sich völlig von der amöboiden Bewegung der Granulozyten und Monozyten unterscheidet. Die ersten Bewegungen nach Kulturansatz bestehen aus einem Ausstrecken von spitzigen Pseudopodien. Diese Bewegung kann nach

wenigen Minuten oder erst nach 2 - 6 Stunden einsetzen. Bei der Ortsbewegung haben die Lymphozyten ein definiertes Vorder- und Hinterende. Das in Richtung der Bewegung liegende Ende der Zelle bildet große, stumpfe Pseudopodien von beiden Seiten her aus, die manchmal gleichzeitig auftreten, so daß eine Y-Figur entsteht. Die großen proliferierenden Zellen bewegen sich wie die kleinen Lymphozyten. Wenn die Zellen jedoch agglutinieren, wird die Bewegung derart modifiziert, daß sich die Zellen abrunden und kleine, spitze Pseudopodien von der freien Oberfläche ausstrecken.

Manchmal heften sich die Lymphozyten an der Glaswand fest, runden sich ab und strecken kleine, spitze Pseudopodien aus.

Sich teilende Zellen runden sich ab und verharren bewegungslos. Nach der Teilung beginnen die Tochterzellen innerhalb weniger Minuten mit typischer Lymphozytenbewegung.

Die von MARSHALL und ROBERTS (1965) beschriebenen Bewegungstypen treten auch bei den hier gefilmten Lymphozyten auf.

Schlußbetrachtung

Menschliche Leukozytenkulturen haben eine große Bedeutung als Testsystem in der Strahlen- und Chemomutagenese. Mögliche mutagene Wirkungen von Schadstoffen können direkt an den Chromosomen des Menschen getestet werden:

in vitro Test: Es werden Lymphozyten in der Kultur mit dem zu prüfenden Agens behandelt.

in vivo Test: Es werden die Chromosomen von Personen untersucht, die mit Schadstoffen in Berührung kamen.

Eine Analyse der Leukozytenkultur war notwendig geworden, nachdem über zwei Lymphozytenpopulationen mit einer unterschiedlichen Strahlenempfindlichkeit in der Leukozytenkultur berichtet wurde (BENDER und BREWEN, 1969; STEFFEN und MICHALOWSKI, 1977).

Phytohemagglutinin wird am häufigsten bei der Mutagenitätsprüfung als Stimulans für Leukozytenkulturen verwendet. Die gebräuchlichsten Kulturmedien sind: Ham's F 10 und TC Medium 199.

Der Vergleich der Leukozytenkulturen, die verschiedene Medien oder verschiedene Stimulanzien enthielten, führte zu folgenden Erkenntnissen:

- Die Lymphozyten proliferieren in Ham's F 10 Medium früher als in TC Medium 199. Durch Verkürzung der Kulturdauer können Kultur-

einflüsse auf die Aberrationsrate vermieden werden. Daher ist Ham's F 10 Medium für die Kultivierung von Lymphozyten vorteilhafter als TC Medium 199.

- PHA hat sich im Vergleich zu Con A, PWM und LPS als das vorteilhafteste Mitogen bezüglich der Teilungsaktivität der Lymphozyten in der Kultur erwiesen.

Der Verlauf der DNS-Synthese in PHA-stimulierten Leukozytenkulturen ist biphasisch: Es wurde bereits nachgewiesen, daß zwei Zellpopulationen zu unterschiedlichen Zeiten in der Kultur mit der DNS-Synthese beginnen (DUDIN et al., 1974).

Aufgrund des biphasischen Verlaufs der DNS-Synthese können

1. beide Zellpopulationen durch den Zeitpunkt ihrer DNS-Synthese unterschieden werden,
 2. die Zellen beider Populationen gezielt in verschiedenen Zellzyklusstadien mit Mutagenen behandelt werden,
 3. Zellen der beiden Populationen nach Behandlung mit Mutagenen durch radioaktive Markierung einer Zellpopulation während der S-Phase getrennt ausgewertet werden,
 4. Einflüsse von Agenzien auf den DNS-Syntheseverlauf direkt nachgewiesen werden.
- Es ist wichtig für Mutagenitätsexperimente erste Mitosen zu erfassen, um Eliminierung der geschädigten Zellen während der Proliferation zu vermeiden. Con A hat den Vorteil, daß Lymphozyten, die mit diesem Mitogen stimuliert werden, nur einen Zellzyklus durchlaufen, wenn sie nicht ständig in Kontakt mit dem Mitogen sind (PAULI und STRAUSS, 1973). Wird Con A 24 Stunden nach Kulturansatz wieder aus der Kultur entfernt, treten nur erste Mitosen auf.
 - Lipopolysaccharid von *Salmonella typhosa* stimuliert menschliche Lymphozyten kaum zur Proliferation. Die Teilungsaktivität der Zellen in der Kultur blieb bis 74 Stunden Kulturdauer sehr gering. Es ist jedoch nicht auszuschließen, daß sie an den folgenden Kulturtagen nicht noch ansteigt.
Somit würde LPS von *S. typhosa* ein Mitogen für menschliche B-Lymphozyten darstellen.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Die autoradiographischen Analysen zur DNS-Synthese und die Bestimmung der Mitoseindices von Leukozytenkulturen erbrachten folgende Ergebnisse:

1. In Phytohämagglutinin (PHA)-stimulierten Leukozytenkulturen ist der Verlauf der DNS-Synthese biphasisch, unabhängig vom verwendeten Kulturmedium (Ham's F 10 und TC Medium 199). Die beiden ersten DNS-Synthesemaxima liegen in der Ham's F 10-Kultur bei etwa 35 und 40 Stunden Kulturdauer und in der TC Medium 199-Kultur bei etwa 39 und 44 Stunden. Der biphasische Verlauf der DNS-Synthese wurde mit der Existenz zweier Lymphozytenpopulationen, die zu unterschiedlichen Zeiten mit der DNS-Synthese beginnen, gedeutet.
2. Veränderungen der Serum- und Phytohämagglutinin-Konzentration in der Leukozytenkultur wirken sich nicht signifikant auf den Mitoseindex bei 72 Stunden Kulturdauer aus.
3. Anreicherung von Ham's F 10 Medium mit Aminosäuren (L-Arginin, L-Cystein, L-Asparagin und L-Glutaminsäure) und Anreicherung von TC Medium 199 mit Na-Pyruvat, Vitamin B₁₂, ZnSO₄·7H₂O, CuSO₄·5H₂O verändern die Mitoseindices bei 72 Stunden Kulturdauer im Vergleich zu den Kontrollen nicht signifikant.
4. In Leukozytenkulturen, die mit Phytohämagglutinin (PHA), Concanavalin A (Con A), Pokeweed Mitogen (PWM) oder Lipopolysaccharid (LPS) von *Salmonella typhosa* stimuliert werden, ist der Verlauf der DNS-Synthese völlig unterschiedlich. Das wird auf den verschiedenen physikalischen Charakter der Mitogene und die immunologische Vielfalt der Lymphozyten zurückgeführt.
5. Unter Einwirkung von Bleiacetat tritt in der PHA-stimulierten Leukozytenkultur eine Aufspaltung der einzelnen Synthesemaxima in jeweils zwei Submaxima auf.

Lymphozyten aus PHA- und PWM-stimulierten Leukozytenkulturen wurden cinematographisch dokumentiert.

VI. LITERATUR

- ABDOU N. I., and N.L. ABDOU, 1973: Immunoglobulin receptors on human leucocytes. III. Comparative study of human bone marrow and blood B cells: role of IgM receptors
Clin. exp. Immunology 13, S. 45 - 54
- ADEN D.P., and N.D. REED, 1973: In vitro immune response to lipopolysaccharide: thymus-derived cells not required
Immun. Commun. 2, S. 335 - 340
- AHERN T., and J.E. KAY, 1975: Protein synthesis and ribosome activation during the early stages of phytohaemagglutinin lymphocyte stimulation
Exptl. Cell Res. 92, S. 513 - 515
- ALEXANDER E. L., and B. WETZEL, 1975: Human lymphocytes: similarity of B and T cell surface morphology
Science 188, S. 732 - 734
- ALEXANDER E., SANDERS S., and R. BRAYLAN, 1976: Purported difference between human T- and B-cell surface morphology is an artefact
Nature 261, S. 239 - 241
- ALFORD R.H., 1970: Metal cation requirements for phytohemagglutinin-induced transformation of human peripheral blood lymphocytes
J. Immunol. 104 (3), S. 698 - 703
- ANDERSSON B., and BLOMGREN H., 1971: Evidence for thymus-independent humoral antibody production in mice against polyvinylpyrrolidone and E. coli lipopolysaccharide
Cell. Immunol. 2, S. 411 - 424
- ANDERSSON J., G.M. EDELMAN, G. MÖLLER, and O. SJÖBERG, 1972a: Activation of B lymphocytes by locally concentrated concanavalin A
Eur. J. Immunol. 2 (3), S. 233 - 235
- ANDERSSON J., G. MÖLLER, and O. SJÖBERG, 1972b: B lymphocytes can be stimulated by Con A in the presence of humoral factors - released by T cells
Eur. J. Immunol. 2 (1), S. 99 - 101
- ANDERSSON J., G. MÖLLER, and O. SJÖBERG, 1972c: Selective induction of DNA synthesis in T and B lymphocytes
cell. immunol. 4 (4), S. 381 - 393

- ANDERSSON J., O. SJÖBERG, and G. MÖLLER, 1972e: Induction of immunoglobulin and antibody synthesis in vitro by lipopolysaccharides
Eur. J. Immunol. 2 (4), S. 349 - 353
- ANDERSSON J., O. SJÖBERG, and G. MÖLLER, 1972f: Mitogens as probes for immunocyte activation and cellular cooperation
Transplant. Rev. 11, S. 131 - 177
- ANDERSSON L.C., NORDLING S., and P. HÄYRY, 1973: Proliferation of B and T cells in mixed lymphocyte cultures
J. exp. Med. 138, S. 324 - 329
- ANKER P., M. STROUN, and P.A. MAURICE, 1975: Spontaneous release of DNA by human blood lymphocytes as shown in an in vitro system
Cancer Res. 35, S. 2375 - 2382
- ANKER P., STROUN M., and P.A. MAURICE, 1976: Spontaneous extracellular synthesis of DNA released by human blood lymphocytes
Cancer Res. 36, S. 2832 - 2839
- ARAKAKI D.T., and R.S. SPARKES, 1963: Microtechnique for culturing leukocytes from whole blood
Cytogenetics 2, S. 57 - 60
- ASKONAS B.A., ROELANTS G.E., MAYOR-WITHEY K.S., and J.L. WELSTEAD, 1976: Dual pathway of B lymphocyte differentiation in vitro
Eur. J. Immunol. 6, S. 250 - 256
- AUGENER W., COHNEN G., REUTER A., and G. BRITTINGER, 1974: Decrease of T lymphocytes during ageing
The Lancet, S. 1164
- BACH J.F., and DARDENNE M., 1973: Antigen recognition by T lymphocytes III. Evidence for two populations of thymus-dependent rosette-forming cells in spleen and lymph-nodes
Cell. Immun. 6, S. 394 - 406
- BARAT N., and AVRAMEAS S., 1973: Surface and intracellular localization of concanavalin A in human lymphocytes
Exp. Cell Res. 76 (2), S. 451 - 455
- BARKER B.E., FARNES P., and LA MARCHE P.H., 1966: Peripheral blood plasmacytosis following systemic exposure to Phytolacca Americana (pokeweed)
Pediatrics 38, S. 490 - 493
- BARKER B.E., and P. FARNES, 1967: Histochemistry of blood cells treated with pokeweed mitogen
Nature (London) 214, S. 787 - 789

- BARNETT R.E., SCOTT R.E., FURCHT L.T., and KERSEY J.H., 1974:
Evidence that mitogenic lectins induce changes in
lymphocyte membrane fluidity
Nature 249, S. 465 - 466
- BEEK B., and OBE G., 1974: The human leukocyte test system
II. Different sensitivities of sub-populations to a
chemical mutagen
Mutation Res. 24, S. 395 - 398
- BEEK B., and OBE G., 1975: The human leukocyte test system IV. The
RNA synthesis pattern in the first G_1 -phase of the
cell cycle after stimulation with PHA
Mutation Res. 29, S. 165 - 168
- BEEK B., and OBE G., 1976: The human leukocyte test system X. Higher
sensitivity to X-irradiation in the G_0 -stage of the
cell cycle of early as compared to late replicating
cells
Human Genetics, in press
- BENDER M.A., and PRESCOTT D.M., 1962: DNA synthesis and mitosis in
cultures of human peripheral leukocytes
Exptl. Cell Res. 27, S. 221 - 229
- BENDER M.A., and BREWEN J.G., 1969: Factors influencing chromosome
aberration yields in the human peripheral leucocyte
system
Mutation Res. 8, S. 383 - 399
- BETEL I., and K.J. VAN DEN BERG, 1972: Interaction of concanavalin A
with rat lymphocytes
Eur. J. Biochem. 30, S. 571 - 578
- BIANCHI N. O., and M.S.A. DE BIANCHI, 1965: DNA replication sequence
of human chromosomes in blood cultures
Chromosoma 17, S. 273 - 290
- BIBERFELD P., 1971: Morphogenesis in blood lymphocytes stimulated
with phytohaemagglutinin (PHA): a light and electron
microscopic study
Acta pathol. Microbiol. Scand. Suppl. 223, S. 5 - 70
- BIBERFELD P., BIBERFELD G., and P. PERLMANN, 1971: Surface immuno-
globulin light chain determinants on normal and PHA-
stimulated human blood lymphocytes studied by immuno-
fluorescence and electronmicroscopy
Exptl. Cell Res. 66, 177 - 189

- BIBERFELD P., and MELLSTEDT H., 1974: Selective activation of human B-lymphocytes by suboptimal doses of pokeweed mitogen (PWM). Quantitation and ultrastructure of the stimulated cells
Exptl. Cell Res. 89, S. 377 - 388
- BISHOP C.C., and J.E. GILL, 1971: Inhibition of Escherichia coli DNA polymerase by monovalent cations
Biochim. biophys. Acta 227, S. 97 - 105
- BLITSTEIN-WILLINGER E., SCHULZ G., and T. DIAMANTSTEIN, 1976: Changes in thymocyte reactivity to lectins induced by B-cell mitogens of the type of sulphated polyanions
Immunology 30 (4), S. 529 - 535
- BLOOM B.R., and BENNETT B., 1966: Mechanism of a reaction in vitro associated with delayed-type hypersensitivity
Science 153, S. 80 - 82
- BÖRJESON J., REISFIELD R., CHESSIN L.N., WELSH P., and DOUGLAS S.D., 1966: Studies on human peripheral blood lymphocytes in vitro. I. Biological and physiochemical properties of pokeweed mitogen
J. exp. Med. 124, S. 859 - 872
- BOLDT D., and SKINNER A. M., and S. KORNFELD, 1972: Studies of two subpopulations of human lymphocytes differing in responsiveness to concanavalin A
J. Clin. invest. 51 (12), S. 3225 - 3234
- BOND V.P., CRONKITE E.P., FLIEDNER T.M. and SCHORK P., 1958: Deoxyribonucleic acid synthesizing cells in peripheral blood of normal human beings
Science 128, S. 202 - 203
- BOSMAN F.T., VAN DER PLOEG M., SCHABERG A., and P. VAN DUIJN, 1975: Chromosome preparations of human blood lymphocytes - evaluation of techniques
Genetica 45, S. 425 - 433
- BRITTINGER G., und E. KÖNIG, 1969: Lymphocytenstimulierung durch Pokeweed-Mitogen (PWM)
Klin. Wschr. 47, S. 1307 - 1313
- BUCKTON K.E., and PIKE M.C., 1964: Chromosome Investigations on lymphocytes from irradiated patients: Effect of Time in Culture
Nature 202, S. 714 - 715

- BURNET SIR MACFARLANE, 1973: Körper-eigene und körperfremde Substanzen bei Immunprozessen
Georg Thieme Verlag Stuttgart
- BYFIELD P.E., STRATTON J.A., and R. SMALL, 1974: Lymphocyte response after radiotherapy
The Lancet, S. 309
- CARDONA E., LESSLER M.A., and G.P. BRIERLEY, 1971: Mitochondrial oxidative phosphorylation: interaction of lead and inorganic phosphate
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 136, S. 300 - 304
- CARSTAIRS K., 1962: The human small lymphocyte: its possible pluripotential quality
The Lancet i, S. 829 - 832
- CAVE MAC DONALD, 1965: Reverse patterns of thymidine- H^3 incorporation in human chromosomes
Hereditas 54, S. 338 - 355
- CERNY J., 1974: Stimulation of bone marrow haemopoietic stem cells by a factor from activated T cells
Nature 249, S. 63 - 66
- CHESSIN L.N., BÖRJESON M.D.J., PATRICIA M.D., WELSH D., DOUGLAS S.D., and H.L. COOPER, 1966: Studies on human peripheral blood lymphocytes in vitro II. Morphological and biochemical studies on the transformation of lymphocytes by pokeweed mitogen
J. Exp. Med. 124, S. 873 - 885
- CHESTER J.K., 1972: The role of zinc ions in the transformation of lymphocytes by phytohaemagglutinin
Biochem. J. 130 (1), S. 133 - 139
- CHILLER J.M., SKIDMORE B.J., and MORRISON D.C., and W.O. WEIGLE, 1973: Relationship of the structure of bacterial lipopolysaccharides to its function in mitogenesis and adjuvant activity
Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.) 70, S. 2129 - 2133
- CHOIE D.D., and G.W. RICHTER, 1972a: Cell proliferation in rat kidneys after prolonged treatment with lead
Am. J. Pathol. 68 (2), S. 359 - 370
- CHOIE D.D., and RICHTER G.W., 1972: Cell proliferation in rat kidney induced by lead acetate and effects of uninephrectomy on the proliferation
Am. J. Pathol. 66, S. 265 - 276

- CHURCH R.L., and R.A. CONSIGLI, 1971: DNA fragmentation in a clonal line of rat pituitary tumor
Biochem. Biophys. Res. Commun. 42, S. 31 - 36
- CLINE M.J., and D.W. GOLDE, 1974: Production of colony-stimulating activity by human lymphocytes
Nature 248, S. 703 - 704
- COOPER E.H., BARKHAN P., and A.J. HALE, 1962: Observations on the proliferation of human leucocytes cultured with phytohemagglutinin
Brit. J. Haemat. 2, S. 101 - 111
- COOPER E.H., and MILTON J.D., 1964: The incorporation and degradation of pyrimidine DNA precursors by human leucocytes
Brit. J. Cancer 18, S. 701 - 713
- COOPER H.L., and A.D. RUBIN, 1965: RNA metabolism in lymphocytes stimulated by phytohemagglutinin: initial response to phytohemagglutinin
Blood 25, S. 1014 - 1027
- COOPER H.L., 1969: Ribosomal ribonucleic acid wastage in resting and growing lymphocytes
J. Biol. Chem. 244 (20), S. 5590 - 5596
- COOPER H.L., 1973: Effects of mitogens on the mitotic cycle: a biochemical evaluation of lymphocyte activation in: Drugs and The Cell Cycle (herausgegeben von: ZIMMERMAN A.M., PADILLA G.M. und I.L. CAMERON, Academic Press New York and London)
- COUTINHO A., and G. MÖLLER, 1973: Mitogenic properties of the thymus-independent antigen pneumococcal polysaccharide S III
Eur. J. Immunol. 3, S. 608 - 613
- COUTINHO A., and E. MÖLLER, 1973a: In vitro induction of specific immune responses in the absence of serum: requirement for nonspecific T or B cell mitogens
Eur. J. Immunol. 3, S. 531 - 537
- COUTINHO A., and G. MÖLLER, 1973b:
B cell mitogenic properties of thymus-independent antigens
Nat. New. Biol. 245, S. 12 - 14
- COWLING D.C., QUAGLINO D., and DAVIDSON E., 1963: Changes induced by tuberculin in leucocyte cultures
The Lancet ii, S. 1091 - 1094

- DAVID J.R., AL-ASKARI S., LAWRENCE H.S., and S.L. THOMAS, 1964:
Delayed hypersensitivity in vitro I The specificity
of inhibition of cell migration by antigens
J. Immunol. 93, S. 264 - 273
- DIAMANTSTEIN T., and BLITSTEIN-WILLINGER E., 1974: T cell-independent
development of B memory cells
Eur. J. Immunol. 4, S. 830
- DIAMANTSTEIN T., BLITSTEIN-WILLINGER E., and G. SCHULZ, 1974:
Polyanions and lipopolysaccharide acts on different
subpopulations of B cells
Nature 250, S. 596 - 597
- DIAMANTSTEIN T., and A. ULMER, 1975: Regulation of DNA synthesis by
guanosine-5'-diphosphate, cyclic guanosine-3',5'-
monophosphate, and cyclic adenosine-3',5'-monophos-
phate in mouse lymphoid cells
Exptl. Cell Res. 93, S. 309 - 314
- DIAZ-JOUANEN E., WILLIAMS R.C.jr., and K.G. STRICKLAND, 1975:
Age-related changes in T and B cells
The Lancet i, S. 688 - 689
- DIXON J.F.P., O'BRIEN R.L., and J.W. PARKER, 1975: Periodate-induced
lymphocyte transformation V. Inhibition of periodate-
induced transformation of human peripheral lympho-
cytes with aldehyde-blocking agents
Exptl. Cell Res., 96, S. 383 - 387
- DOENHOFF M.J., JANOSSY G., GREAVES M.F., GOMER K.J., and J. SNAJDR,
1974: Lymphocyte activation VI. A re-evaluation of
factors affecting the selectivity of polyclonal
mitogens for mouse T and B cells
J. Clin. Exp. Immunol. 17, S. 475 - 490
- DOUGLAS S.D., HOFFMAN P.F., BÖRJESON J., and L.N. CHESSIN, 1967:
Studies on human peripheral blood lymphocytes in
vitro III. Fine structural features of lymphocyte
transformation by PWM
J. Immunol. 98, S. 17 - 30
- DOUGLAS S.D., and H.H. FUDENBERG, 1969: In vitro development of
plasma cells from lymphocytes following pokeweed
mitogen stimulation: a fine structural study
Exptl. Cell Res. 54, S. 277 - 279
- DOUGLAS S.D., 1972: Electron microscopic and functional aspects of
human lymphocyte response to mitogens
Transpl. Rev. 11, S. 39 - 59

- DUDIN G., 1974: Autoradiographische Analysen zur DNS-Synthese und Bestimmung der Mitoseindices (Die Zwei-Tage-Kultur menschlicher Lymphozyten)
Diplomarbeit, Berlin
- DUDIN G., BEEK B., and G. OBE, 1974: The human leukocyte test system I. DNA-synthesis and mitoses in PHA-stimulated 2-day cultures
Mutation Res. 23, S. 279 - 281
- DUDIN G., BEEK B., and G. OBE, 1976: The human leukocyte test system VIII. DNA synthesis and mitoses in 3-day cultures stimulated with pokeweed mitogen
Human Genet. 32, S. 323 - 327
- DUMONDE D.C., WOLSTENCROFT R.A., PANAYI G.S., MATTEW M., MORLEY J., and W.T. HOWSON, 1969: "Lymphokines". Non-antibody mediators of cellular immunity generated by lymphocyte activation
Nature (London) 224, S. 38 - 42
- DUTTON R.W., MC CARTHY M.M., MISHELL R.J., and D.J. RAIDT, 1970: Cell components in the immune response IV. relationship and possible interactions
Cell. Immunol. 1, S. 196 - 206
- EDELMAN G.M., CUNNINGHAM B.A., REEKE G.N.jr, BECKER J.W., WAXDAL M.J., and J.L. WANG, 1972: The covalent and three-dimensional structure of Concanavalin A
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 69, S. 2580 - 2584
- EDELMAN G.M., 1976: Erkennung und Kontrolle an der Zelloberfläche
Naturw. Rdsh. 29 (5), S. 145 - 150
- ELFENBEIN G.J., HARRISON M.R., and J. GREEN, 1973: Demonstration of proliferation by bone marrow derived lymphocytes of guinea pigs, mice and rabbits in response to mitogen stimulation in vitro
J. Immunol. 110 (5), S. 1334 - 1339
- EPSTEIN L.B., and F. STOHLMAN jr, 1964: RNA synthesis in cultures of normal human peripheral blood
Blood 24, S. 69 - 75
- ETLINGER H.M., HODGINS H.O., and J.M. CHILLER, 1976: Evolution of the lymphoid system I. Evidence for lymphocyte heterogeneity in rainbow trout revealed by the organ distribution of mitogenic response
J. Immunol. 116, S. 1547 - 1553

- EVANS H.J., and D. SCOTT, 1969: The induction of chromosome aberrations by nitrogen mustard and its dependence on DNA synthesis
Proc. Roy. Soc. B. 173, S. 491 - 512
- EVANS R., GRANT C.K., COX H., STEELE K., and P. ALEXANDER, 1972: Thymus-derived lymphocytes produce an immunologically specific macrophage-arming factor
J. exp. Med. 136, S. 1318 - 1322
- FARNES P., BARKER B.E., BROWNHILL L.E., and H. FANGER, 1964: Mitogenic activity in *Phytolacca americana* (Pokeweed)
The Lancet ii, S. 1100 - 1101
- FARRAR J.J., 1975: Xenogeneic effect. 1. Antigen and Mitogen-stimulated human lymphocytes produce a non-antigen-specific factor which reconstitutes antibody response of T-Cell-deficient mouse spleen cells
J. Immunol. 115 (5), S. 1295 - 1300
- FELDMANN M., CONE R.E., and J.J. MARCHALONIS, 1973: Cell interactions in the immune response in vitro. VI. Mediation by T cell surface monomeric IgM
Cell. Immunol. 9, S. 1 - 11
- FERBER E., and RESCH K., 1973: Phospholipid metabolism of stimulated lymphocytes: Activation of acyl-CoA: Lysolecithin acyltransferase in microsomal membranes
Biochim. Biophys. Acta 296, S. 335 - 349
- FERBER E., and K. RESCH, 1976: Phospholipidstoffwechsel stimulierter Lymphozyten Untersuchungen zum molekularen Mechanismus der Aktivierung
Naturwissenschaften 63, S. 375 - 381
- FIBACH E., GERASSI E., and L. SACHS, 1976: Nature 259, S. 127 - 129
Induction of colony formation in vitro by human lymphocytes
Nature 259, S. 127 - 129
- FORD W.L., 1973: Advances in cellular immunology
Publ. Roy. Coll. Physcns. Edinb. 44, S. 63 - 76
- FORSQREN A., SVEDJELUND A., and W. WIGZELL, 1976: Lymphocyte stimulation by protein A of *Staphylococcus aureus*
Eur. J. Immunol. 6, S. 207 - 213
- FREEDMAN M.H., and M.C. RAFF, 1975: Induction of increased calcium uptake in mouse T lymphocytes by concanavalin A and its modulation by cyclic nucleotides
Nature 255, S. 378 - 382

- FUNDERBURGH J., VASSALLI P., and B. MACH, 1974: RNase-sensitive DNA-synthesis in antigen-stimulated mouse lymphocytes
EXPERIENTIA 30 (6), S. 702
- GAJL-PECZALSKA K.J., HALLGREN H., KERSEY J.H., ZUSMAN J., and E.J. YUNIS, 1974: B lymphocytes during ageing
The Lancet ii, S. 163
- GALANAUD P., CREVON M.-C., ERARD D., WALLON C., and J. DORMONT, 1976: Two processes for B-cell triggering by T-independent antigens as evidenced by the effect of azathioprine
Cell. Immunol. 22, S. 83 - 92
- GANI R., 1976: The nucleoli of cultured human lymphocytes I. Nucleolar morphology in relation to transformation and the DNA cycle
Exptl. Cell Res. 97, S. 249 - 258
- GEHA R.S., ROSEN F.S., and MERLER E., 1974: Unresponsiveness of human B lymphocytes to phytohaemagglutinin
Nature 248, S. 426 - 428
- GERSHON R.K., COHEN P., HENCIN R., and S.A. LIEBHABER, 1972: Suppressor T cells
J. Immunol. 108, S. 586 - 590
- GERY I., GERSHON R.K., and B.H. WAKSMAN, 1972: Potentiation of the T-lymphocyte response to mitogens: I. the responding cell
J. Exp. Med. 136 (1), S. 128 - 148
- GERY I., KRÜGER J., and S.Z. SPIESEL, 1972a: Stimulation of B lymphocytes by endotoxin. Reactions of thymus-deprived mice and karyotypic analysis of dividing cells in mice bearing T₆T₆ thymus grafts
J. Immunol. 108, S. 1088 - 1091
- GINSBURG H., 1971: Lysis of target cell monolayers by lymphocytes stimulated with pokeweed mitogen
Transplantation 11, S. 408 - 411
- GIRARD J.P. et B. FERNANDES, 1974: Etude de la stimulation, in vitro, des lymphocytes humains par des lipopolysaccharides bactériens
Schweiz. med. Wschr. 104, S. 1389 - 1391
- GOLDMAN R., and RAZ A., 1975: Concanavalin A and the in vitro induction in macrophages of vacuolation and lysosomal enzyme synthesis
Exp. Cell Res. 96, S. 393 - 405

- GORCZYNSKI R.M., MILLER R.G., and R.A. PHILLIPS, 1973: Reconstitution of T cell-depleted spleen cell populations by factors derived from T cells III. Mechanism of action of T cell-derived factors
J. Immunol. 111, S. 900 - 913
- GORMLEY I.P., and A. ROSS, 1972: The morphology of phytohaemagglutinin (PHA)-stimulated lymphocytes and permanent lymphoid cell lines seen by the scanning electron microscope
Europ. J. Cancer 8 (5), S. 491 - 494
- GREAVES M.F., and S. BAUMINGER, 1972: Activation of T and B lymphocytes by insoluble phytomitogens
Nature New Biol. 235, S. 67 - 70
- GREAVES M.F., BAUMINGER S., and G. JANOSSY, 1972: Lymphocyte activation: III. Binding sites for phytomitogens on lymphocyte subpopulations
Clin. Exp. Immunol. 10 (3), S. 537 - 554
- GREAVES M.F., and G. JANOSSY, 1972: Elicitation of selective T and B lymphocyte responses by cell surface binding ligands
Transplant. Rev. 11, S. 87 - 130
- GREAVES M.F., and G. BROWN, 1973: A human B lymphocyte specific antigen
Nature New Biol. 246, S. 116 - 119
- GREAVES M.F., JANOSSY G., and M. DOENHOFF, 1974: Activation of human T and B lymphocytes by polyclonal mitogens
Nature 248, S. 698 - 701
- GRONOWICZ E., and A. COUTINHO, 1974: Selective triggering of B cell subpopulations by mitogens
Eur. J. Immunol. 4 (11), S. 771 - 776
- HALL M.R., MEINKE W., GOLDSTEIN D.A., and R.A. LERNER, 1971: Synthesis of cytoplasmic membran-associated DNA in lymphocyte nucleus
Nature New Biol. 234, S. 227 - 229
- HAM R.G., 1963: An improved nutrient solution for diploid chinese hamster and human cell lines
Exptl. Cell Res. 29, S. 515 - 526
- HAMBLIN A.S., MAINI R.N., and D.C. DUMONDE, 1976a: Human transfer factor in vitro I. Augmentation of lymphocyte transformation to tuberculin PPD
Clin. Exp. Immunol. 23, S. 290 - 302

- HAMBLIN A.S., DUMONDE D.C., and R.N. MAINI, 1976b: Human transfer factor in vitro II. Augmentation of lymphocyte transformation to phytohaemagglutinin
Clin. Exp. Immunol. 23, S. 303 - 313
- HARTOG M., CLINE M.J., and G.M. GRODSKY, 1967: The response of human leucocyte cultures to stimulation by tuberculin and phytohaemagglutinin measured by the uptake of radio-active thymidine
Clin. Exp. Immunol. 2, S. 217 - 228
- HAUSEN P., STEIN H., and H. PETERS, 1969: On the synthesis of RNA in lymphocytes stimulated by phytohaemagglutinin. The Activity of deoxyribonucleoprotein-bound and soluble RNA polymerase
Eur. J. Biochem. 9, S. 542 - 549
- HEDFORS E., HOLM G., and D. PETTERSSON, 1975: Activation of human peripheral blood lymphocytes by concanavalin A dependence of monocytes
Clin. Exp. Immunol. 22, S. 223 - 229
- HEDFORS E., HOLM G., and B. ÖHNELL, 1976: Variations of blood lymphocytes during work studied by cell surface markers, DNA synthesis and cytotoxicity
Clin. Exp. Immunol. 24, S. 328 - 335
- HEMMINKI K., 1975: Synthesis of chromatin proteins in resting and stimulated human lymphocyte populations
Exptl. Cell Res. 93, S. 63 - 70
- HENKART P.A., and R.J. FISHER, 1975: Characterization of lymphocyte surface receptors for Con A and PHA
J. Immunol. 114, S. 710 - 714
- HIRSCHHORN K., BACH F., KOLODNY R.L., FIRSCHEIN I.L., and N. HASHEM, 1963: Immune response and mitosis of human lymphocytes in vitro
Science 142, S. 1185 - 1187
- HOGG N.M., and M.F. GREAVES, 1972: Antigen-binding thymus derived lymphocytes: II. Nature of the immunoglobulin determinants
Immunology 22 (6), S. 967 - 980
- HOVI T., ALLISON A.C., and WILLIAMS S.C., 1976: Proliferation of human peripheral blood lymphocytes induced by A 23187, a streptomycin antibiotic
Exptl. Cell Res. 96, S. 92 - 100

- HUDSON L., SPRENT J., MILLER J.F.A.P., and J.H.L. PLAYFAIR, 1974:
B cell-derived immunoglobulin on activated mouse
T lymphocytes
Nature 251, S. 60 - 62
- HÜLSER D.F., and PETERS J.H., 1972: Contact cooperation in stimulated
lymphocytes: II. Electrophysiological investigations
on intercellular communication
Exptl. Cell Res. 74, S. 319 - 326
- HUOT J., NOSAL G.L., and S. RADOUCO-THOMAS, 1972: Effects of lithium
chloride on normal and neoplastic cells in vitro
Experientia 28, Is. 456 - 457
- HUTCHINSON F., RAFFLE E.J., and T.M. MACLEOD, 1972: The specificity
of lymphocyte transformation in vitro by nickel salts
in nickel sensitive subjects
J. Invest. Dermatol. 58 (6), S. 362 - 365
- INBAR M., BEN-BASSAT H., and L. SACHS, 1973: Temperature-sensitive
activity of the surface membrane in the activation of
lymphocytes by lectins
Exptl. Cell Res. 76, S. 143 - 151
- INBAR M., and M. SHINITZKY, 1975: Decrease in microviscosity of
lymphocyte surface membrane associated with stimulation induced by concanavalin A
Eur. J. Immunol. 5, S. 166 - 170
- IVANYI L., and T. LEHNER, 1974: Stimulation of human lymphocytes by
B cell mitogens
Clin. Exp. Immunol. 18, S. 347 - 356
- IVANYI L., 1976: Modulation of antigen-induced stimulation of human
lymphocytes by LPS
Clin. Exp. Immunol. 23, S. 385 - 388
- JANEWAY C.A., SHARROW S.O., and E. SIMPSON, 1975: T-cell populations
with different functions
Nature 253, S. 544 - 546
- JANOSSY G., and M.F. GREAVES, 1971: Lymphocyte activation I. Response
of T and B lymphocytes to phytoimitogens
Clin. Exp. Immunol. 9, S. 483
- JANOSSY G., and M.F. GREAVES, 1972: Lymphocyte activation: II. Discriminating stimulation of lymphocyte subpopulations
by phytoimitogens and heterologous antilymphocyte sera
Clin. Exp. Immunol. 10 (3), S. 525 - 536

- JANOSSY G., SHOHAT M., GREAVES M., and R.R. DOURMASHKIN, 1973:
Lymphocyte activation: IV. The ultrastructural pattern of the response of mouse T and B cells to mitogenic stimulation in vitro
Immunol. 24 (2), S. 211 - 227
- JANOSSY G., SNAJDR J., and M. SIMAK-ELLIS, 1976: Patterns of B-lymphocyte gene expression elicited by lipopolysaccharide mitogen
Immunol. 30 (6), S. 799 - 810
- JASINSKA J., STEFFEN J.A., and A. MICHALOWSKI, 1970: Studies on in vitro lymphocyte proliferation in cultures synchronized by the inhibition of DNA synthesis. II. Kinetics of the initiation of the proliferative response
Exptl. Cell Res. 61, S. 333 - 341
- JERNE N.K., 1973: The immune system
Scientific american 229, S. 52 - 60
- JOHANSEN J., 1972: DNA-synthesis and distribution of first and second divisions in 72-h cultures of human leukocytes
Experientia 28 (4), S. 416 - 417
- JOHNSON E.M., KARN J., and V.G. ALLFREY, 1974: Early nuclear events in the induction of lymphocyte proliferation by mitogens. Effects of concanavalin A on the phosphorylation and distribution of non histone chromatin proteins
J. Biol. Chem. 249 (15), S. 4990 - 4999
- KAMIN R.M., DAVIS W.C., and H.H. FUDENBERG, 1969: Biochemical and morphologic aspects of phytomitogens: jack bean, wax bean, pokeweed, and phytohemagglutinin
In: Proc. Third Annual Leucocyte Culture Conf. 1967 (ed. W.O. RIEKE) New York 1969 p. 607
- KAY J.E., 1970: The role of the stimulant in the activation of lymphocytes by PHA
Exptl. Cell Res. 58, S. 185 - 188
- KAY J.E., 1971: Interaction of lymphocytes and phytohemagglutinin. inhibition by chelating agents
Exptl. Cell Res. 68, S. 11 - 16
- KILLANDER D., and R. RIGLER, 1965: Initial changes of deoxyribonucleoprotein and synthesis of nucleic acid in phytohemagglutinin-stimulated human leukocytes in vitro.
exptl. Cell Res. 39, S. 701 - 704

- KILLANDER D., and R. RIGLER, 1969: Activation of deoxyribonucleo-protein in human leukocytes stimulated by phytohem-agglutinin 1. Kinetics of the binding of acridine orange to deoxyribonucleoprotein
Exptl. Cell Res. 54, S. 163 - 170
- MAC KINNEY A.A. jr, STOHLMAN F. jr, and G. BRECHER, 1962: The kinetics of cell proliferation in cultures of human peripheral blood
Blood 19, S. 349 - 358
- KIRCHNER H., and H. RÜHL, 1970: Stimulation of human peripheral lymphocytes by Zn^{2+} in vitro
Exptl. Cell Res. 61, S. 229 - 230
- KISILEW P., HIRST J.A., SHIKU H., BEVERLEY P.C.L., HOFFMANN M.K., BOYSE E.A., and H.F. OETTGEN, 1975: Ly antigens as markers for functionally distinct subpopulations of thymus-derived lymphocytes of the mouse
Nature 253, S. 219 - 220
- KOEPPE D.E., and R.J. MILLER, 1970: Lead effects on chorn mitochondrial respiration
Science 167, S. 1376 - 1377
- KORENBERG J.R., and E.F. FREEDLENDER, 1974: Giemsa technique for the detection of sister chromatid exchanges
Chromosoma (Berlin) 48, S. 355 - 360
- KORNFELD R., and KORNFELD S., 1970:
The structure of a phytohemagglutinin receptor site from human erythrocyte
J. Biol. Chem. 245, S. 2536 - 2545
- KRIGMAN M.R., CRANE D., and R.A. GOYER, 1968: Lysosomal alterations in lead nephropathy
Fed. Proc. 27, S. 410
- LAMELIN J.P., and P. VASSALLI, 1971: Inhibition of macrophage migration by a soluble factor from lymphocytes stimulated with PHA or ALS
Nature (London) 229, S. 426 - 428
- LATT S.A., 1973: Microfluorometric detection of deoxyribonucleic acid replication in human metaphase chromosomes
Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.) 70, S. 3395 - 3399

- LENER R.A., MEINKE W., and D.A. GOLDSTEIN, 1971: Membrane-associated DNA in the cytoplasm of diploid human lymphocytes
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 68, S. 1212 - 1216
- LEVIS W.R., and J.H. ROBBINS, 1970, Effect of glass-adherent cells on the blastogenic response of 'purified' lymphocytes to phytohemagglutinin
Exptl. Cell Res. 61, S. 153 - 158
- LEWIS W.H., 1931: Locomotion of lymphocytes
Bull. Johns Hopkins Hosp. 49, S. 29 - 36
- LI J.G., and E.E. OSGOOD, 1949: A method for the rapid separation of leukocytes and nucleated erythrocytes from blood or marrow with a phytohemagglutinin from red bean (*Phaseolus vulgaris*)
Blood 4, S. 670
- LIMA-DE-FARIA A., REITALU J., and S. BERGMAN, 1961: The pattern of DNA synthesis in the chromosomes of man
Hereditas 47, S. 695 - 704
- LING N.R., and E.M. HUSBAND, 1964: Specific and non-specific stimulation of peripheral lymphocytes
The Lancet i, S. 363 - 365
- LOEB L.A., EWALD L., and S.S. AGARWAL, 1970: DNA-polymerase and DNA replication during lymphocyte transformation
Cancer research 30, S. 2514 - 2520
- MACKLER B.F., WOLSTENCROFT R.A., and D.C. DUMONDE, 1972: Concanavalin A as an inducer of human lymphocyte mitogenic factor
Nature New Biol. 239, S. 139 - 142
- MACKLER B.F., ALTMAN L.C., ROSENSTREICH D.L., and J.J. OPPENHEIM, 1974: Induction of lymphokine production by EAC and of blastogenesis by soluble mitogens during human B-cell activation
Nature 249, S. 834 - 837
- MAINI R.W., BRYCESON A.D., WOLSTENCROFT R.A., and D.C. DUMONDE, 1969: Lymphocyte mitogenic factor in man
Science 224, S. 43 - 44
- MAINO V.C., GREEN M.M., and M.J. CRUMPTON, 1974: The role of calcium ions in initiating transformation of lymphocytes
Nature 251, S. 324 - 327
- MARCHALONIS J.J., and R.E. CONE, 1973: Biochemische und biologische Charakteristika der Immunglobuline an der Lymphozytenoberfläche
Transplantation Rev. 14, S. 3 - 49

- MARCHALONIS J.J., 1975: Lymphocyte surface immunoglobulins. Molecular properties and function as receptors for antigen are discussed
Science 190, S. 20 - 29
- MARSHALL W.H., and K.B. ROBERTS, 1965: Continuous cinematography of human lymphocytes cultured with a phytohaemagglutinin including observations on cell division and interphase
Quart. J. Exptl. Physiol. 50, S. 361 - 374
- MARX J.L., 1976: Immunology: role of immune response genes
Science 191, S. 277 - 278 + S. 318
- MAYER E.P., TEODORESCU M., REITER H., and S. DRAY, 1976: Rabbit lymphocyte subpopulations II. Separation and characterization of two Ig^+ cell subpopulations
Cell. Immunol. 22, S. 76 - 82
- MELCHERS F., and J. ANDERSSON, 1973: Synthesis, surface deposition and secretion of immunoglobulin M in bone marrow-derived lymphocytes before and after mitogenic stimulation
Transplantation Rev. 14, S. 76 - 130
- MELLO R.S., KWAN D., and A. NORMAN, 1974: Chromosome aberrations and T-cell survival in human lymphocytes
Radiat. Res. 60, S. 482 - 488
- MELVYN F., GREAVES M., and S. BAUMINGER, 1972: Activation of T and B lymphocytes by insoluble phyto mitogens
Nature New Biol. 235, S. 67
- MICHALOWSKI A., 1963: Time course of DNA-synthesis in human leukocyte cultures
Exptl. Cell Res. 32, S. 609 - 612
- MÖLLER G., and NOBORU KASHIWAGI, 1972: Antigen-induced suppression of the in vitro lymphocyte response to different antigens and mitogens
Immunol. 22, S. 441 - 456
- MONAHAN T.M., FRITZ R.R., and C.W. ABELL, 1975: Sodium periodate stimulation of human lymphocytes. A comparison between normal and chronic lymphocytic leukemia lymphocytes
Exptl. Cell Res. 93, S. 505 - 508
- MOORHEAD J.r., CONNOLLY J.J., and MC FARLAND W., 1967: Factors affecting the reactivity of human lymphocytes in vitro I. Cell number, duration of culture, and surface area
J. Immunol. 92, S. 413 - 419

- MOORHEAD P.S., NOWELL P.C., MELLMAN W.J., BATTIPS D.M., and D.A. HUNGERFORD, 1960: Chromosome preparation of leukocytes cultured from human peripheral blood
Exptl. Cell Res. 20, S. 613 - 616
- MORGAN J.F., MORTON H.J., and R.C. PARKER, 1950: Nutrition of animal cells in tissue culture I. Initial studies on a synthetic medium
Proc. Soc. exp. Med. 73, S. 1 - 8
- NAGEL E., ALBRECHT R., NAGEL G., GAUS W., and A. JAEGER, 1974: Stimulation of human lymphocytes in vitro by bacterial hydrolysates
Experientia 30 (8), S. 946 - 947
- NASPITZ C.K., and M. RICHTER, 1968: The response of human peripheral lymphocytes to various mitogenic agents in vitro
Intern. Arch. Allergy Appl. Immunol. 33, S. 411 - 415
- NILSSON B., 1972: Differential effect of medium change in lymphocyte cultures stimulated by PPD tuberculin or PHA
Cell. Immunol. 3 (2), S. 333 - 337
- NOVOGRODSKY A., and E. KATCHALSKI, 1971: Lymphocyte transformation induced by Concanavalin A and its reversion by methyl- α -D mannopyranoside
Biochim. Biophys. Acta 228, S. 579 - 583
- NOVOGRODSKY A., and E. KATCHALSKI, 1972: Membrane site modified on induction of the transformation of lymphocytes by Periodate
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 69, S. 3207 - 3210
- NOWELL P.C., 1960: Phytohemagglutinin: an initiator of mitosis in cultures of normal human leukocytes
Cancer Res. 20, S. 462 - 466
- NOWOTNY A., 1961: Chemical structure of a phosphomucolinid and its occurrence in some strains of salmonella
J. Amer. Chem. Soc. 83, S. 501 - 503
- NOWOTNY A., 1969: Molecular aspects of endotoxic reactions
Bacteriological Rev. 33, S. 72 - 98
- OBE G., BRANDT K., and B. BEEK, 1976: ThHuman leukocyte test system IX. DNA synthesis and mitoses in PHA-stimulated 2-day cultures set up with Eagle's Minimal Essential Medium (MEM)
Hum. Genet. 33, S. 263 - 268.

- OLSEN I., and G. HARRIS, 1974: Uptake and release of DNA by lymphoid tissue and cells
Immunology 27, S. 973 - 987
- OLSSON L., and M.H. CLAEISSON, 1973: Studies of subpopulations of theta-bearing lymphoid cells
Nature New Biol. 244, S. 50 - 51
- OPPENHEIM J.J., and S. PERRY, 1965: Effects of endotoxins on cultured leukocytes
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 118, S. 1014 - 1019
- PARKER J.W., O'BRIEN R.L., STEINER J., and P PAOLILLI, 1973: Periodate-induced lymphocyte transformation: II. Character of response and comparison with phytohemagglutinin and pokeweed mitogen stimulation
Exptl. Cell Res. 78, S. 279 - 286
- PARKHOUSE R.M.E., JANOSSY G., and M.F. GREAVES, 1972: Selective Stimulation of IgM synthesis in mouse B lymphocytes by pokeweed mitogen
Nature New Biol. 235, S. 21 - 23
- PARR I., WHEELER E., and P. ALEXANDER, 1973: Similarities of the Anti-tumor actions of endotoxin, lipid A, and double-stranded RNA
Brit. J. Cancer 27, S. 370 - 389
- PAULI R.M., and B.S. STRAUSS, 1973: Proliferation of human peripheral lymphocytes characteristics of cells once stimulated or re-stimulated by concanavalin A
Exptl. Cell Res. 82, S. 357 - 366
- PEAVY D.L., ADLER W.H., and R.T. SMITH, 1970: The mitogenic effects of endotoxin and staphylococcal enterotoxin B on mouse spleen cells and human peripheral lymphocytes
J. Immunol. 105, S. 1453 - 1458
- PEAVY D.L., SHANDS J.W., ADLER W.H., and R.T. SMITH, 1971: Comparison of the in vitro mitogenic effects of endotoxins (LPS) and staphylococcal enterotoxin B (SEB) on cells from the spleen, thymus and lymph nodes of the mouse
Fed. Proc. 30, S. 396
- PEGNUM G.D., and E. THOMPSON, 1971: Inhibition by lymphocyte nuclei of DNA and RNA synthesis in stimulated lymphocytes and leukemic cells
Br. J. Exp. Pathol. 52 (5), S. 560 - 564
- PEGNUM G.D., PERERA D.J.B., and E. THOMPSON, 1972: The mitogenic effects of isologous nuclear material
immunol. 23 (1), S. 13 - 18

- PELC S.K., HARRIS G., and I. CALDWELL, 1972: The relationship between antibody formation and deoxyribonucleic acid (DNA) synthesis in mouse spleen during primary and secondary response to sheep erythrocytes (SRC)
- PETERS J.H., 1972: Contact cooperation in stimulated lymphocytes:
1. Influence of cell contact on unspecifically stimulated lymphocytes
Exptl. Cell Res. 74 (1), S. 179 - 186
- PHILLIPS B., and I.M. ROITT, 1973: Evidence for transformation of human B lymphocytes by PHA
Nature new Biol. 241, S. 254 - 256
- PICK F., BROSTOFF I., KREJCI J., and J.L. TURK, 1970: Interaction between "sensitized lymphocytes" and antigen in vitro
II. Mitogen-induced release of skin reactive and macrophage migration inhibitory factors
Cell. Immunol. 1, S. 92 - 109
- PIGUET P.F., and P. VASSALLI, 1972: Thymus-independent (B) cell proliferation in spleen cell cultures of mouse radiation chimeras stimulated by phytohemagglutinin or allogenic cells
- PLATE J.M.D., 1976: Soluble factors substitute for T-T cell collaboration in generation of T-killer lymphocytes
Nature 260, S. 329 - 331
- PLOTZ P.H., and N. TALAL, 1967: Fractionation of splenic antibody-forming cells on glass bead columns
J. Immunol. 99, S. 1236 - 1242
- POLGAR P.R., KIBRICK S., and J.M. FOSTER, 1968: Reversal of PHA-induced blastogenesis in human lymphocyte cultures
Nature 218, S. 596 - 597
- POLGAR P.R., and S. KIBRICK, 1970: Origin of small lymphocytes following blastogenesis induced by short-term PHA stimulation
Nature 225, S. 857 - 858
- POI TIS G., PLASSARA M.G., and H. THOMOU-POLITI, 1975: DNA present in multilayer rosette formed by lymphocytes stimulated with phytohaemagglutinin
Nature (London) 257, S. 485 - 486
- POWELL A.E., and M.A. LEON, 1970: Reversible interaction of human lymphocytes with the mitogen concanavalin A
Exptl. Cell Res. 62, S. 315 - 325

- PRICE D.J., and J. TIMSON, 1971: Temporal variation in mitotic index of phytohaemagglutinin stimulated human lymphocytes
Acta Haematol. (Basel) 46 (6), S. 321 - 325
- RABIN B.S., and T. WHITESIDE, 1974: "Per cent T cells"
The Lancet ii, S. 46
- RAFF M.C., 1969: Theta isoantigen as a marker of thymus-derived lymphocytes in mice
Nature 224, S. 378 - 379
- RAFF M.C., 1973: T and B lymphocytes and immune responses
Nature 242, S. 19 - 23
- RAFF M.C., 1976: Cell-surface immunology. Antibodies, serving as precise chemical tools, have helped to shape concepts of cell-membrane structure
Scientific American 234, S. 30 - 39
- RESCH K., FERBER E., ODENTHAL J., and H. FISCHER, 1971: Early changes in the phospholipid metabolism of lymphocytes following stimulation with phytohemagglutinin and with lysolecithin
Eur. J. Immunol. 1, S. 163
- RESCH K., and E. FERBER, 1972: Phospholipid metabolism of stimulated lymphocytes. Effects of phytohemagglutinin, Concanavalin A, and an anti-immunoglobulin serum
Eur. J. Biochem. 27, S. 153 - 161
- RESCH K., GELFAND E.W., HANSEN K., and E. FERBER, 1972: Lymphocyte activation: rapid changes in the phospholipid metabolism of plasma membranes during stimulation
Eur. J. Immunol. 2, S. 598 - 601
- RESCH K., FERBER E., PRESTER M., and E.W. GELFAND, 1976: Mitogen-induced membrane changes and cell proliferation in T lymphocyte subpopulations
Eur. J. Immunol. 6, S. 168 - 174
- RIETSCHEL E.Th., GOTTERT H., LÜDERITZ O., and O. WESTPHAL, 1972: Nature and linkages of the fatty acids present in the lipid-A component of salmonella lipopolysaccharides
Eur. J. Biochem. 28, S. 166 - 173
- RIGLER R., and D. KILLANDER, 1969: Activation of deoxyribonucleoprotein in human leukocytes stimulated by phytohemagglutinin II. Structural changes of deoxyribonucleoprotein and synthesis of RNA
Exptl. Cell Res. 54, S. 171 - 180

- ROBBINS J.H., 1964: Tissue culture studies of the human lymphocyte
-Experiments under controlled conditions provide new
information on this cell's function and potentiality
Science 146, S. 1648 - 1654
- ROBBINS E., and T. PEDERSON, 1970: Iron: its intracellular localization
and possible role in cell division
Proc. Nat. Acad. Sci. 66, S. 1244 - 1251
- ROBBINS E., FANT J., and W. NORTON, 1972: Intracellular iron-binding
macromolecules in HeLa cells
Proc. Nat. Acad. Sci. 69, S. 3708 - 3712
- ROGERS J.C., BOLDT D., KORNFIELD S., SKINNER A., and C.R. VALERI, 1972:
Excretion of deoxyribonucleic acid by lymphocytes
stimulated with phytohemagglutinin or antigen
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69 (7), S. 1685 - 1689
- ROGERS J.C., 1976: Characterization of DNA excreted from phytohem-
agglutinin-stimulated lymphocytes
J. Exp. Med. 143, S. 1249 - 1264
- SALZMAN N.P., PELLEGRINO M., and P. FRANCESCHINI, 1966: Biochemical
changes in phytohemagglutinin stimulated human
lymphocytes
Exptl. Cell Res. 44, S. 73 - 83
- SARMA D.S.R., and J. RUTMAN, 1972: Synthesis and fragmentation of
DNA in phytohemagglutinin stimulated human circula-
ting lymphocytes
Fed. Proc. 31, S. 607
- SARMA D.S.R., and J. ZUBROFF, 1973: Synthesis and fragmentation of
DNA in phytohaemagglutinin-stimulated human peripheral
blood lymphocytes
Immunol. Commun. 2, S. 277 - 285
- SASAKI M., and A. NORMAN, 1966: Proliferation of human lymphocytes in
culture
Nature 210, S. 913 - 914
- SASAKI M., SEKIZAWA T., TAKAHASHI H., ABO T., and K. KUMAGAI, 1975:
Heterogeneity of human T lymphocytes to bind sheep
erythrocytes and mitogenic responses of their sub-
populations
J. Immunol. 115, S. 1509 - 1514
- SATO C., and K. KOJIMA, 1976: Phytohemagglutinin-induced change in the
distribution of acid sugars in surface membrane of
lymphoid cells and blocking of the radiation effect
Exptl. Cell Res. 98, S. 90 - 94

- SAWYER W.H., HAMMARSTRÖM S., MÖLLER G., and I.J. GOLDSTEIN, 1975:
Precipitin and mitogenic behavior of dimeric and tetrameric concanavalin A
Eur. J. Immunol. 5, S. 507 - 510
- SHELLEKENS P.Th.A., and v.P. EIJSSVOOGEL, 1968: Lymphocyte transformation in vitro I. Tissue culture conditions and quantitative measurements
Clin. Exp. Immunol. 3, S. 571 - 584
- SCHMIDTKE J.R., and F.J. DIXON, 1972: Immune response to a hapten coupled to a non-immunogenic carrier
J. Exp. Med. 136, S. 392 - 397
- SCHMIDTKE J.R., and J.S. NAJARIAN, 1975: Synergistic effects on DNA synthesis of phytohemagglutinin or concanavalin A and lipopolysaccharide in human peripheral blood lymphocytes
J. Immunol. 114, S. 742 - 746
- SCHÖPF E., SCHULZ K.H., and I. LENSEE, 1969: Untersuchungen über den Lymphozytentransformationstest bei Quecksilber Allergie. Unspezifische Transformation durch Hg-Verbindungen
Arch. klin. exptl. Dermatologie 234, S. 420 - 433
- SCHWARTZ H.J., LEON M.A., and R.P. PELLE, 1970: Concanavalin A-induced release of skin-reactive factor from lymphoid cells
J. Immunol. 104, S. 265 - 268
- SCOTT D., 1968: The additive effect of X-rays and maleic hydrazide in inducing chromosomal aberrations at different stages of the mitotic cycle in *Vicia faba*
Mutation Res. 5, S. 65 - 92
- SENDA N., TAMURA H., SHIBATA N., YOSHITAKE J., KONDO K., and K. TANAKA, 1975: The mechanism of the movement of leucocytes
Exptl. Cell Res. 91, S. 393 - 407
- SERAVALLI E., 1976: Isolation by isoelectric focusing of a mitogenic substance released by stimulated human lymphocytes
Cell. Immunol. 21, S. 70 - 78
- SHAPIRO I.M., and L.YA LEVINA, 1966: Autoradiographical study on the time of nuclear protein synthesis in human leucocyte blood culture
Exptl. Cell Res. 47, S. 75 - 85

- SHEPPARD H.W.jr, REDELMAN D., and S. SELL, 1976: In vitro studies of the rabbit immune system IV. Differential mitogen responses of isolated T and B cells
Cell. Immunol. 24, S. 34 - 44
- SHOHAT M., JANOSSY G., and R.R. DOURMASHKIN, 1973: Development of rough endoplasmic reticulum in mouse splenic lymphocytes stimulated by mitogens
Eur. J. Immunol. 3, S. 680- 687
- SIEGEL I., GRIECO M.H., and S. GUPTA, 1974: Subpopulations of B lymphocytes in human tonsils and peripheral blood
The Lancet ii, S. 215 - 216
- SILVEIRA N.P.A., MENDES N.F., and M.E.A. TOLNAI, 1972: Tissue localization of two populations of human lymphocytes distinguished by membrane receptors
J. Immunol. 108 (5), S. 1456 - 1460
- SKOOG V.T., 1972: Time course of macromolecule synthesis in human lymphocyte cultures stimulated by antilymphocyte globulin and phytohemagglutinin
Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 43 (4), S. 548 -562
- SKOOG V.T., WEBER.T.H., and W. RICHTER, 1974: Studies on the interaction between mitogens and human lymphocytes in vitro
Exptl. Cell Res. 85, S. 339 - 350
- SLACIK-ERBEN R., 1976: Wirkung von Trenimon, Natriumfluorid und deren Kombination auf den Zellzyklus und die Rate chromosomaler Aberrationen in menschlichen Lymphozytenkulturen in vitro
Thesis, Berlin
- SMITH J.L., and C.R. BARKER, 1972: Production of mitogenic factor by concanavalin A stimulated lymphocytes
Clin. Exp. Immunol. 12, S. 507 - 514
- SMITH K.A., CHESS L., and M.R. MARDINEY jr., 1972: The characteristics of lymphocyte tritiated thymidine incorporation in response to mumps virus
Cell. Immunol. 5 (4), S. 597 - 603
- SMITH M.A., EVANS J., and C.M. STEEL, 1974: Age-related variation in proportion of circulating T-cells
The Lancet, S. 922 - 924
- SÖREN L., 1973: Variability of the time at which PHA stimulated lymphocytes initiate DNA synthesis
Exptl. Cell Res. 78, S. 201 - 208

- SONI S.L., KALNINS V.I., and G.H. HAGGIS, 1975: Localisation of caps on mouse B lymphocytes by scanning electron microscopy
Nature 255, S. 717 - 718
- STEEL C.M., EVANS J., and M.A. SMITH, 1974: Physiological variation in circulating B cell: T cell ratio in man
Nature 247, S. 387 - 388
- STEEL C.M., EVANS J., and M.A. SMITH, 1975: Age-related changes in T and B cells
The Lancet i, S. 914 - 915
- STEFFEN J., and L. SÖREN, 1968: Changes in dry mass of the PHA-stimulated human lymphocytes during blast transformation
Exptl. Cell Res. 53, S. 652 - 659
- STEFFEN J.A., and W.M. STOLZMANN, 1969: Studies on in vitro lymphocyte proliferation in cultures synchronized by the inhibition of DNA-synthesis. I. Variability of S plus G₂ periods of first generation cells
Exptl. Cell Res. 56, S. 453 - 460
- STEFFEN J., and A. MICHALOWSKI, 1973: Heterogeneous chromosomal radiosensitivity of phytohaemagglutinin-stimulated human blood lymphocytes in culture
Mutation Res. 17, S. 367 - 376
- STEVENS R.H., ASKONAS B.A., and J.L. WELSTEAD, 1975: Immunoglobulin heavy chain mRNA in mitogen-stimulated B cells
Eur. J. Immunol. 5, S. 47 - 53
- STEWART C.C., CRAMER C.F., and P.G. STEWARD, 1975: The response of human peripheral blood lymphocytes to phytohemagglutinin: determination of cell numbers
Cell. Immunol. 16, S. 237 - 250
- STOBO J.D., and W.E. PAUL, 1973: Functional heterogeneity of murine lymphoid cells. III. Differential responsiveness of T cells to phytohemagglutinin and Concanavalin A as a probe for T cell subsets
J. Immunol. 110, S. 382 - 375
- STURELID S., 1971: Chromosome-breaking capacity of tepa and analogues in vicia faba and chinese hamster cells
hereditas 68, S. 255 - 276
- TAUSSIG M.J., 1974: T cell factor which can replace T cells in vivo
Nature 248, S. 234 - 236

- TAYLOR R.B., DUFFUS P.W.H., RAFF M.C., and S. de PETRIS, 1971:
Redistribution and pinocytosis of lymphocyte surface
immunoglobulin molecules induced by anti-immunoglobulin antibody
Nature new Biol. 233, S. 225 - 229
- TCHORZEWSKI H., SULOWSKA Z., and A. DENYS, 1973: A new lymphocyte
transforming factor derived from the lysosomes of
polymorphonuclear leucocytes
Experientia (Basel) 29, S. 481 - 483
- VISCHER T., 1972: Mitogenic factors by lymphocyte activation: effect
on T- and B-cells
J. Immunol. 109 (2), S. 401 - 402
- WACKER A., 1974: Molekularbiologische Aspekte der Immunsuppression
Arzneim. Forsch. (drug res.) 24 (2a), S. 245 - 248
- WALDMANN H., POULTON P., and C. DESAYMARD, 1976: Antigen-non-specific
T-cell factor in B-cell activation. origin, biological
properties and failure to show a relationship to
H-2
Immunology 30, S. 723 - 733
- WATSON J., EPSTEIN R., NAKOINZ I., and P. RALPH, 1973: The role of
humoral factors in the initiation of in vitro primary
immune responses II. Effects of lymphocyte mitogens
Immunology 110, S. 43 - 52
- WATSON J., TRENNER E., and M. COHN, 1973a: The use of bacterial
lipopolysaccharides to show that two signals are re-
quired for the induction of antibody synthesis
J. Exp. Med. 138, S. 699 - 714
- WAXDAL M.J., 1974: Isolation, characterization, and biological acti-
vities of five mitogens from pokeweed
Biochemistry 13, S. 3671 - 3676
- WAXDAL M.J., and P.Y. BASHAM, 1974: B and T cell stimulating activi-
ties of multiple mitogens from pokeweed
Nature 251, S. 163 - 164
- WEBER T.H., SKOOG V.T., MATTSSON A., and K. LINDAHL - KIESSLING, 1974:
Kinetics of lymphocyte stimulation in vitro by non-
specific mitogens
Exptl. Cell Res. 85, S. 351 - 361
- WEINSTEIN Y. CHAMBERS D.A., BOURNE H.R., and K.L. MELMON, 1974: Cyclic
GMP stimulates lymphocyte nucleic acid synthesis
Nature 251, S. 352 - 353

- WHITNEY R.B., and R.M. SUTHERLAND, 1972: Requirement of calcium ions in lymphocyte transformation stimulated by phytohemagglutinin
J. Cell Physiol. 80 (3), S. 329 - 338
- WILSON J.D., and G.J.V. NOSSAL, 1971: Identification of human T and B lymphocytes in normal peripheral blood and in chronic lymphocytic leucaemia
The Lancet ii, S. 788 - 791
- WIOLAND M., DONNER M., and C. NEAUPORT-SAUTES, 1976: Modifications of the thymocyte membrane during redistribution of concanavalin A receptors
Eur. J. Immunol. 6, S. 273 - 278
- WOOD D.D., and P.M. CAMERON, 1976: Stimulation of the release of a B cell-activating factor from human monocytes
Cell. Immunol. 21, S. 133 - 145
- YACHNIN S., ALLEN L.W., BARON J.M., and R.H. SVENSON, 1972: The potentiation of phytohemagglutinin-induced lymphocyte transformation by cell-cell interaction; a matrix hypothesis
Cell. Immunol. 3, S. 569 - 589
- YEOMAN L.C., SEEBER S., TAYLOR CH.W., FERNBACH D.J., FALLETTA J.M., JORDAN J.J., and H. BUSCH, 1976: Differences in chromatin proteins of resting and growing human lymphocytes
Exptl. Cell Res. 100, S. 47 - 55
- YOUNKIN L.H., 1975: In vitro response of lymphocytes to phytohemagglutinin (PHA) as studied with antiserum to PHA II. Cell cycle analyses
Experimental Cell Res. 90, S. 374 - 380
- ZANK M.B., KROEBER B., MAHNKE P.-F., and H. KRUG, 1972: Cytophotometric studies on DNA-dynamics in human lymphocyte cultures following phytohemagglutinin (PHA) administration
Exp. Pathol. (Jena) 6, S. 201 - 206

VII. TABELLEN

TABELLE 1: Ham's F-10 - Phytohämagglutinin - Kulturen

Prozentsätze markierter Interphasekerne (über 20 Silberkörner)
und Mitoseindices in Serie A

h : Kulturdauer (Stunden)

N : Gesamtzahl ausgewerteter Kerne

P₀ : markierte Interphasekerne (%)

MI: Mitoseindex in Prozent

Für die Bestimmung des Mitoseindex wurden jeweils 1000 Zellen
ausgewertet

h	N	P _o (%)	MI (%)
23	1000	0,10	
24	1000	0,00	
25	1000	0,20	
26	1000	0,40	
27	1000	0,10	
28	1000	0,70	
29	1000	1,10	
30	500	1,00	
31	1000	3,40	
32	1500	3,40	
33	500	5,40	0,0
34	500	7,00	0,0
35	1000	12,80	0,0
36	500	11,00	0,0
37	1000	1,70	0,1
38	1000	4,20	0,1
39	1000	13,10	0,1
40	1000	11,60	0,1
41	1000	14,40	0,2
42	1000	9,70	0,2
43	500	7,00	0,0
44	500	14,40	0,4
45	500	6,00	0,1
46	500	6,60	0,5
47	500	11,00	0,3
48	500	14,40	0,3
49	1000	2,50	0,5
50	1000	22,40	0,1
51	1000	27,70	0,7
52	1000	25,70	0,8
53	500	15,60	0,8
54	500	12,60	1,2
55	500	0,00	0,6
56	1000	13,75	1,1
57	1000	28,90	0,4
58	500	22,60	2,0
59	1000	31,50	0,9
60	1000	35,70	0,9
61	1000	28,70	0,5
62	1000	35,50	0,6
63	1000	28,40	0,9
64	1000	30,20	0,8
65	500	0,80	0,5
66	500	21,00	1,0
67	500	0,10	1,7
68	1000	23,80	1,4
69	1000	35,50	0,5
70	1000	16,90	1,3
71	1000	34,30	0,3
72	1000	34,20	1,7
73	1000	36,30	1,0
74	1000	40,10	1,5

TABELLE 2: Ham's F-10 - Phytohämagglutinin - Kulturen

Prozentsätze markierter Interphasekerne (über 20 Silberkörner)
und Mitoseindices in Serie B.

h : Kulturdauer (Stunden)
N : Gesamtzahl ausgewerteter Kerne
P₀ : markierte Interphasekerne (%)
MI: Mitoseindex in Prozent

Für die Bestimmung des Mitoseindex wurden jeweils 1000 Zellen
ausgewertet.

h	N	P _o (%)	MI (%)
23	1000	0,00	
24	1000	0,10	
25	1000	0,30	
26	1000	0,50	
27	1000	0,20	
28	1500	0,35	
29	1000	0,80	
30	500	0,60	
31	1000	2,30	
32	1500	2,60	
33	500	1,00	
34	500	4,80	0,0
35	500	4,40	0,0
36	1000	8,80	0,0
37	1000	8,80	0,0
38	1000	2,00	0,0
39	1000	6,00	0,0
40	1000	8,40	0,0
41	1000	10,40	0,0
42	1000	4,30	0,1
43	500	0,80	0,2
44	500	15,20	0,3
45	500	8,80	0,6
46	500	10,40	0,3
47	500	12,20	0,3
48	1000	11,30	0,0
49	1000	4,50	0,8
50	1000	20,10	0,4
51	1000	21,60	0,4
52	500	17,00	0,9
53	1000	10,90	1,4
54	500	1,00	1,2
55	1500	19,40	0,7
56	500	11,40	1,0
57	500	14,60	1,2
58	1000	30,80	1,3
60	1000	33,50	1,2
61	1000	29,30	0,9
62	1000	18,10	0,4
63	1000	28,30	0,8
64	1000	36,30	0,7
65	1500	25,40	1,1
66	1000	9,40	0,7
67	500	4,60	1,2
68	1514	26,20	0,7
69	1000	36,30	0,2
70	1000	32,20	1,8
71	1000	34,90	0,9
72	1000	31,70	1,3
73	1000	35,30	0,8
74	1000	28,90	0,8

TABELLE 3: TC Medium 199 - Phytohämagglutinin - Kulturen

Prozentsätze markierter Interphasekerne mit mehr als 20 Silberkörnern und Mitoseindices in der Serie A.

h : Kulturdauer (Stunden)

N : Gesamtzahl ausgewerteter Kerne

P₀ : markierte Interphasekerne (mehr als 20 Silberkörner) (%)

MI: Mitoseindex in Prozent

Für die Bestimmung des Mitoseindex wurden jeweils 1000 Zellen ausgewertet.

h	N	P ₀ (%)	MI (%)
23	500	0,00	
24	500	0,00	
25	500	0,00	
26	500	0,20	
27	500	0,20	
28	500	0,60	
29	500	0,60	
30	500	0,60	
31	500	0,60	
32	500	0,80	
33	500	1,40	
34	500	2,40	
35	500	3,00	
36	500	3,60	
37	500	3,80	
38	500	3,20	
39	500	8,60	0,0
40	500	6,00	0,0
41	500	6,20	0,0
42	500	7,80	0,0
43	600	9,83	0,0
44	500	12,00	0,1
45	500	7,20	0,0
46	500	11,00	0,1
47	500	5,20	0,0
48	500	9,40	0,1
49	500	13,80	0,4
50	500	8,20	0,2
51	500	14,60	1,0
52	500	17,40	0,3
53	500	11,40	0,7
54	500	10,60	0,8
55	500	12,40	0,5
56	500	16,00	0,7
57	500	14,80	0,3
58	500	16,20	0,4
59	500	3,60	0,4
60	500	10,40	0,6
61	500	15,00	0,7
62	500	18,00	0,5
63	500	15,80	0,6
64	500	22,80	0,8
65	500	16,20	1,1
66	500	22,80	0,8
67	500	20,80	0,5
68	500	17,20	1,0
69	500	18,20	0,8
70	500	18,20	1,2
71	500	15,20	1,0
72	500	24,20	1,0
73	500	15,60	0,7
74	500	1,80	1,5

TABELLE 4: TC Medium 199 - Phytohämagglutinin - Kulturen

Prozentsätze markierter Interphasekerne mit mehr als 20 Silberkörnern und Mitoseindices in der Serie B.

h : Kulturdauer (Stunden)

N : Gesamtzahl ausgewerteter Kerne

P₀ : markierte Interphasekerne (mehr als 20 Silberkörner) (%)

MI: Mitoseindex in Prozent

Für die Bestimmung des Mitoseindex wurden jeweils 1000 Zellen ausgewertet.

h	N	P ₀ (%)	MI (%)
23	1000	0,00	
24	1000	0,00	
25	1000	0,00	
26	1000	0,10	
27	1000	0,20	
28	1000	0,00	
29	1000	0,00	
30	1000	0,10	
31	1000	0,40	
33	1000	0,80	
34	1000	1,90	
35	1000	2,90	
36	1000	2,60	
37	1000	0,30	0,0
38	1000	4,10	0,1
39	1000	1,90	0,0
40	1000	3,40	0,1
41	1000	2,30	0,0
42	1000	4,90	0,0
43	1000	4,80	0,0
44	1000	8,60	0,1
45	1000	2,40	0,1
46	1000	11,60	0,1
47	1000	6,60	0,1
48	1000	4,50	0,0
49	1000	11,80	0,3
50	1000	10,20	0,1
51	1000	14,90	0,3
52	1000	16,00	0,4
53	1000	17,50	0,1
54	1000	17,10	0,3
55	1000	11,90	0,3
57	1000	14,80	0,5
58	1000	23,80	0,5
59	1000	15,60	0,6
60	1000	6,70	1,0
61	1000	10,50	0,4
62	1000	18,10	0,2
63	1000	17,00	0,5
64	1000	12,10	0,6
65	1000	24,20	0,6
66	1000	20,10	0,6
67	1000	19,70	0,7
68	1000	11,30	0,1
70	1000	15,00	0,2
71	1000	19,50	0,2
72	1000	17,50	0,6
73	1000	4,40	1,1
74	1000	5,30	0,9

TABELLE 5:

Prozentsätze markierter Lymphozytenkerne und Mitoseindices in der Serie A der mit Concanavalin A stimulierten Leukozytenkultur.

h : Kulturdauer (Stunde)

N ; Gesamtzahl ausgewerteter Kerne

P₀: markierte Lymphozytenkerne mit mehr als 20 Silberkörnern (%)

P₁: markierte Lymphozytenkerne mit 6-20 Silberkörnern (%)

P₂: markierte Lymphozytenkerne mit 1-5 Silberkörnern (%)

MI: Mitoseindex in Prozent

Für die Bestimmung des Mitoseindex wurden jeweils 1000 Zellen ausgewertet.

h	N	P ₀ (%)	P ₁ (%)	P ₂ (%)	MI (%)
20	500	5,80	8,40	38,60	
21	500	15,00	26,00	19,00	
22	500	15,20	62,60	15,80	
23	500	24,80	28,60	25,20	
24	500	6,40	13,60	34,20	
25	500	8,00	14,80	46,00	
26	500	1,20	47,20	41,80	
27	500	16,60	51,00	27,40	
28	500	52,40	20,60	17,80	
29	500	13,80	24,80	39,20	
30	500	0,40	1,80	45,80	
31	500	2,00	31,00	46,40	
32	500	84,40	12,40	2,40	
33	500	11,00	47,00	28,80	
34	500	13,80	26,20	41,80	
35	500	15,20	44,00	35,80	
36	500	6,80	5,00	41,20	
37	500	5,20	20,40	38,20	
38	500	10,00	27,20	30,20	
39	500	9,00	45,00	28,60	
40	500	4,00	5,20	23,00	
41	500	0,40	7,20	36,80	0,0
42	500	8,00	23,80	50,00	0,1
43	500	1,60	11,20	53,60	0,0
44	500	0,80	16,00	71,00	0,0
45	500	0,60	0,60	20,80	0,0
46	500	16,80	42,40	23,60	0,0
47	500	4,20	30,80	30,80	0,0
48	500	16,00	28,40	30,00	0,1
49	500	4,20	41,80	46,00	0,0
50	500	40,60	47,20	4,60	0,1
51	500	38,00	44,40	6,40	0,1
52	500	44,40	28,60	14,00	0,2
53	500	13,40	16,80	29,20	0,1
54	500	4,40	41,00	17,60	0,1
55	500	5,20	8,60	61,80	0,1
56	500	6,40	31,60	46,60	0,1
57	500	18,40	29,20	22,40	0,4

TABELLE 6:

Prozentsätze markierter Interphasekerne mit mehr als 20 Silberkörnern und Mitoseindices in der Serie B der mit Concanavalin A stimulierten Leukozytenkultur.

h : Kulturdauer (Stunden)

N : Gesamtzahl ausgewerteter Kerne

P_o : markierte Interphasekerne (mehr als 20 Silberkörner) (%)

MI: Mitoseindex in Prozent

Für die Bestimmung des Mitoseindex wurden jeweils 1000 Zellen ausgewertet.

h	N	P _o (%)	MI (%)
20	1000	0,50	
21	1000	1,10	
22	1000	1,30	
23	1000	0,50	
24	1000	2,20	
25	1000	5,60	
26	1000	1,20	
27	1000	3,40	
28	1500	13,60	
29	1000	5,70	
30	1057	0,28	
31	1003	0,50	
32	1003	40,08	
33	1000	3,50	
34	1000	1,00	
35	1350	3,04	
36	1009	6,05	
37	1000	1,70	
38	1000	4,20	
39	1000	1,00	
40	1000	2,80	0,0
41	1000	3,90	0,1
42	1022	5,09	0,1
43	1000	6,50	0,0
44	1006	1,29	0,1
45	1000	2,00	0,0
46	1000	52,40	0,0
47	1000	7,90	0,3
48	1008	23,51	0,0
49	2048	13,22	0,0
50	1000	22,30	0,0
51	1000	0,00	0,2
52	1020	32,65	0,0
53	1010	16,73	0,2
54	1004	4,08	0,0
55	1007	4,47	0,0
56	1000	5,60	0,0
57	1005	9,25	0,1

TABELLE 7:

Anteile polymorphkerniger Leukozyten in der mit Concanavalin A stimulierten Blutkultur zwischen 20 und 57 Stunden Kulturdauer und Prozentsätze markierter polymorpher Leukozytenkerne mit mehr als 5 Silberkörnern.

h : Kulturdauer (Stunden)

N : Gesamtzahl polymorphkerniger Leukozyten pro 500 Zellen in Serie A

P_o: markierte polymorphe Leukozytenkerne mit mehr als 5 Silberkörnern (%)

h	N	P _o (%)
20	201	5,47
21	237	17,30
22	168	35,70
23	223	17,04
24	149	2,68
25	199	15,08
26	151	25,17
27	188	32,45
28	145	44,83
29	281	62,28
30	135	0,00
31	211	32,23
32	143	100,00
33	211	42,18
34	20	15,00
35	278	62,59
36	35	5,71
37	287	1,05
38	27	7,41
39	268	37,69
40	37	0,00
41	282	3,19
42	36	52,78
43	225	4,44
44	26	7,69
45	265	0,38
46	135	40,74
47	155	5,16
48	112	10,71
49	174	0,67
50	96	59,38
51	185	57,84
52	103	38,83
53	182	8,79
54	63	3,17
55	176	6,25
56	74	18,92
57	176	1,14

TABELLE 8:

Prozentsätze markierter Lymphozytenkerne und Mitoseindices in Serie A der mit Pokeweed Mitogen stimulierten Leukozytenkultur.

h ; Kulturdauer (Stunden)

N : Gesamtzahl ausgewerteter Kerne

P₀ : markierte Lymphozytenkerne mit mehr als 20 Silberkörnern (%)

P₁ : markierte Lymphozytenkerne mit 6-20 Silberkörnern (%)

P₂ : markierte Lymphozytenkerne mit 1-5 Silberkörnern (%)

MI: Mitoseindex in Prozent

Für die Bestimmung des Mitoseindex wurden jeweils 1000 Zellen ausgewertet.

h	N	P ₀ (%)	P ₁ (%)	P ₂ (%)	MI (%)
23	1000	0,00	0,20	11,20	
24	1000	0,00	3,90	67,70	
25	1000	0,00	0,40	16,60	
26	1000	0,00	0,20	15,40	
27	1000	0,00	0,40	29,90	
28	1000	0,30	1,30	13,60	
29	1000	0,10	1,10	14,20	
30	1000	0,10	1,10	10,40	
31	1000	0,20	1,90	42,80	
32	1000	0,30	0,60	13,20	0,1
33	1000	0,60	1,30	12,50	0,0
34	1000	0,90	0,40	9,00	0,0
35	1000	2,10	0,20	5,60	0,0
36	1000	2,20	1,10	19,20	0,0
37	1000	4,50	1,70	23,70	0,0
38	1000	2,10	0,20	10,70	0,0
39	1000	2,00	2,00	5,30	0,2
40	1000	1,70	1,80	8,50	0,3
41	1000	3,90	2,80	41,00	0,1
42	1000	3,70	0,80	7,40	0,1
43	1000	4,10	0,40	11,10	0,3
44	1000	1,00	1,30	14,70	0,4
45	1000	1,20	4,40	8,90	0,2
46	1000	3,40	1,40	10,60	0,2
47	1000	1,10	1,30	8,70	0,4
48	1000	6,00	2,60	17,30	0,1
49	1000	6,00	2,00	36,10	0,1
50	1000	3,60	0,70	10,10	0,6
51	1000	6,70	5,40	45,00	0,2
52	1000	4,60	3,00	47,30	0,3
53	1000	7,10	1,40	8,30	0,9
54	1000	3,40	0,70	22,40	0,0
55	1000	8,90	2,10	23,40	0,3
56	1000	10,50	0,80	10,70	0,4
57	1000	13,90	4,70	22,90	1,0
58	1000	4,80	0,50	18,40	0,5
59	1000	10,80	1,00	12,80	0,2
60	1000	4,20	3,30	11,80	1,6
61	1000	12,40	1,00	18,40	0,6
62	1000	11,80	3,20	44,30	1,0
63	1000	10,80	5,60	28,80	0,9
64	1000	9,40	4,00	36,90	0,8
65	1000	14,80	6,60	44,90	0,6
66	1000	8,10	0,60	8,00	0,2
67	1000	12,60	3,80	23,90	1,1
68	1000	5,20	2,10	23,80	0,5
69	1000	9,80	3,20	37,20	1,0
70	2000	16,20	3,10	16,65	0,9
71	1000	20,10	2,30	14,20	1,5
72	1000	11,30	6,90	31,90	0,5
73	1000	13,40	8,40	27,60	1,7
74	1500	14,10	10,80	23,95	1,1

TABELLE 9:

Prozentsätze markierter Lymphozytenkerne und Mitoseindices in der Serie B der mit Pokeweed Mitogen stimulierten Leukozytenkultur.

h : Kulturdauer (Stunden)

N : Gesamtzahl ausgewerteter Kerne

P₀: markierte Lymphozytenkerne mit mehr als 20 Silberkörnern (%)

P₁: markierte Lymphozytenkerne mit 6-20 Silberkörnern (%)

P₂: markierte Lymphozytenkerne mit 1-5 Silberkörnern (%)

MI: Mitoseindex in Prozent

Für die Bestimmung des Mitoseindex wurden jeweils 1000 Zellen ausgewertet.

h	N	P ₀ (%)	P ₁ (%)	P ₂ (%)	MI (%)
23	1000	0,00	2,30	42,50	
24	1000	0,10	0,90	46,50	
25	1000	0,00	0,10	18,40	
26	1000	0,10	0,50	19,30	
27	1000	0,10	0,20	25,30	
28	1000	0,00	0,10	11,50	
29	1000	0,10	0,20	23,70	
30	1000	0,10	0,30	24,70	
31	1000	1,20	0,10	23,30	
32	1000	0,00	0,60	33,90	0,0
33	1000	0,80	1,50	22,40	0,0
34	1000	0,70	0,60	10,80	0,0
35	1000	0,40	0,40	32,00	0,0
36	1000	1,40	0,30	27,80	0,0
37	1000	1,90	0,90	14,70	0,0
38	1000	1,90	0,80	22,70	0,0
39	1000	2,10	0,70	9,30	0,0
40	1000	2,10	0,30	8,00	0,0
41	1000	2,80	0,60	39,80	0,3
42	1000	3,50	1,90	10,40	0,2
43	1000	5,50	3,90	14,00	0,1
44	1000	5,00	1,60	10,00	0,0
45	1000	7,30	2,00	9,60	0,2
46	1000	5,60	2,20	5,60	0,6
47	1000	3,30	1,10	4,50	0,3
48	1000	3,90	0,70	18,40	0,5
49	1000	5,30	2,30	20,80	0,2
50	1000	6,20	1,80	17,80	0,0
51	1000	7,90	3,00	19,90	0,6
52	1000	4,00	5,40	53,50	0,0
53	1000	7,70	1,30	24,70	0,2
54	1000	4,40	0,70	9,50	0,2
55	1000	9,70	3,40	30,10	0,3
56	1000	5,00	2,60	36,70	0,1
57	1000	9,20	2,60	38,90	0,5
58	1000	6,20	1,30	23,60	0,1
59	1000	11,10	1,40	10,30	0,8
60	1000	6,60	3,80	5,10	0,5
61	1000	10,30	0,80	7,30	0,5
62	1000	11,70	5,80	51,80	0,9
63	1000	12,90	3,40	31,10	0,9
64	1000	15,20	2,60	27,00	1,2
65	1000	10,50	2,20	24,10	0,4
66	1000	14,10	0,50	11,80	1,1
67	1000	19,50	2,80	27,50	0,9
68	1000	12,20	2,10	29,50	0,6
69	1000	21,40	3,30	28,70	1,4
70	2000	19,70	2,55	25,30	1,3
71	1000	7,90	1,30	16,70	0,5
72	1000	16,60	5,70	17,70	1,2
73	1000	17,80	1,40	11,90	0,6
74	1000	13,20	3,30	13,40	1,0

TABELLE 10:

Prozentsätze markierter Lymphozytenkerne und Mitoseindices in der Serie A der mit Lipopolysaccharid stimulierten Leukozytenkultur.

h : Kulturdauer (Stunden)

N : Gesamtzahl ausgewerteter Kerne

P₀: markierte Lymphozytenkerne mit mehr als 20 Silberkörnern (%)

P₁: markierte Lymphozytenkerne mit 6-20 Silberkörnern (%)

P₂: markierte Lymphozytenkerne mit 1-5 Silberkörnern (%)

MI: Mitoseindex in Prozent

Für die Bestimmung des Mitoseindex wurden jeweils 3000 Zellen ausgewertet.

h	N	P ₀ (%)	P ₁ (%)	P ₂ (%)	MI (%)
23	1000	0,00	7,70	71,90	
24	1000	0,40	13,10	69,30	
25	1000	5,60	47,50	44,80	
26	1000	1,20	2,20	60,00	
27	1000	0,70	32,70	63,80	
28	1000	0,20	3,40	59,70	
29	1000	35,90	30,00	30,00	
30	1000	1,00	10,90	74,40	
31	1000	1,40	12,10	73,70	
32	1000	0,80	23,80	68,10	
33	1000	0,10	3,00	58,30	
34	1000	0,70	17,80	70,50	
35	1000	0,20	8,20	70,00	
36	1000	0,20	6,20	60,90	
37	1000	0,10	13,40	25,10	
38	1000	0,10	3,30	65,10	
39	1000	0,20	9,10	80,30	
40	1000	0,80	3,10	26,00	
41	1000	2,10	6,40	51,50	
42	1000	1,30	5,70	43,60	
43	1000	0,50	6,30	70,50	
44	1000	0,50	6,20	38,10	
45	1000	2,10	48,10	47,20	
46	1000	0,40	9,60	71,20	
47	1000	2,50	6,00	80,10	
48	1000	0,00	2,40	58,10	
49	1000	1,10	3,40	46,10	
50	1000	0,00	0,40	29,50	
51	1000	0,10	2,70	63,50	
52	1000	0,00	2,10	46,50	
53	1000	0,20	11,80	74,00	
54	1000	1,00	18,20	65,50	
55	1000	0,10	3,30	59,90	
56	1000	0,20	1,80	56,60	
57	1000	0,10	3,20	53,10	
58	1000	0,40	1,10	38,80	
59	1000	0,20	4,30	76,90	
60	1000	0,70	5,80	71,60	
61	1000	0,50	32,10	60,50	
62	1000	6,60	48,10	42,40	
63	1000	1,70	3,70	46,00	
64	1000	9,80	17,60	37,60	
65	1000	0,20	45,90	49,30	
66	1000	0,20	10,50	64,70	
67	1000	1,60	35,20	56,40	0,100
68	1000	1,40	25,70	63,00	0,033
69	1000	0,70	12,00	75,60	0,000
70	1000	0,70	6,20	58,30	0,033
71	1000	0,90	6,40	64,50	0,000
72	1000	0,70	3,20	65,30	0,033
73	1000	0,60	1,50	58,70	0,000
74	1000	4,70	35,90	49,70	0,033

TABELLE 11:

Prozentsätze markierter Lymphozytenkerne und Mitoseindices in der Serie B der mit Lipopolysaccharid stimulierten Leukozytenkultur.

h : Kulturdauer (Stunden)

N : Gesamtzahl ausgewerteter Kerne

P₀ : markierte Lymphozytenkerne mit mehr als 20 Silberkörnern (%)

P₁ : markierte Lymphozytenkerne mit 6-20 Silberkörnern (%)

P₂ : markierte Lymphozytenkerne mit 1-5 Silberkörnern (%)

MI: Mitoseindex in Prozent

Für die Bestimmung des Mitoseindex wurden jeweils 3000 Zellen ausgewertet.

n	N	P ₀ (%)	P ₁ (%)	P ₂ (%)	MI (%)
23	1000	0,10	1,00	57,30	
24	1000	0,10	1,40	48,70	
25	1000	0,30	14,80	78,10	
26	1000	0,30	0,40	21,90	
27	1000	57,50	38,00	4,10	
28	1000	29,70	28,40	34,60	
29	1000	15,70	58,60	22,80	
30	1000	0,10	12,70	76,40	
31	1000	7,10	60,00	31,90	
32	1000	0,80	45,30	51,70	
33	1000	61,80	35,10	2,80	0,033
34	1000	40,30	48,80	10,70	
35	1000	1,90	17,10	67,70	
36	1000	0,00	15,90	56,80	
37	1000	0,30	8,90	57,90	
38	1000	0,30	17,50	62,20	
39	1000	0,00	3,10	60,00	
40	1000	0,10	2,70	50,50	
41	1000	2,50	9,00	46,20	
42	1000	2,90	11,90	38,70	0,033
43	1000	0,20	40,90	56,10	
44	1000	2,10	62,60	30,40	
45	1000	0,20	12,00	64,80	
46	1000	0,40	17,20	67,80	
47	1000	0,90	6,10	70,00	
48	1000	0,20	10,10	70,40	
49	1000	1,50	21,10	69,80	
50	1000	2,20	36,20	57,00	
51	1000	1,20	6,00	55,40	
52	1000	0,00	3,80	50,90	0,033
53	1000	5,50	67,60	25,90	
54	1000	2,90	76,00	19,90	
55	1000	0,40	4,90	64,00	
56	1000	0,30	10,40	76,00	
57	1000	1,60	6,50	72,20	
58	1000	0,00	3,00	45,10	
59	1000	0,00	3,60	80,90	
60	1000	0,20	20,20	53,50	
61	1000	36,70	31,90	29,50	
62	1000	7,10	31,20	56,40	
63	1000	0,10	0,50	22,20	
64	1000	3,10	14,00	43,10	
65	1000	1,30	16,00	67,70	
66	1000	1,20	17,40	58,20	0,033
67	1000	2,80	32,80	51,70	0,000
68	1000	0,20	6,00	71,60	0,067
69	1000	1,10	3,10	41,90	0,067
70	1000	1,50	19,10	62,60	0,000
71	1000	0,50	12,50	66,10	0,100
72	1000	0,80	5,90	66,70	0,133
73	1000	0,40	15,00	77,40	0,033
74	1000	1,30	11,20	67,90	0,033

TABELLE 12:

Anteile polymorphkerniger Leukozyten in der mit Lipopolysaccharid stimulierten Blutkultur zwischen 23 und 74 Stunden Kulturdauer und Prozentsätze markierter polymorpher Leukozytenkerne mit mehr als 5 Silberkörnern.

h : Kulturdauer (Stunden)

N_A : Gesamtzahl polymorphkerniger Leukozyten pro 1000 Zellen in Serie A

N_B : Gesamtzahl polymorphkerniger Leukozyten pro 1000 Zellen in Serie B

$P_o(\%)_A$: markierte polymorphe Leukozytenkerne mit mehr als 5 Silberkörnern (%) in Serie A

$P_o(\%)_B$: markierte polymorphe Leukozytenkerne mit mehr als 5 Silberkörnern (%) in Serie B

h	N_A	$P_O(\%)_A$	N_B	$P_O(\%)_B$
23	404	12,38	389	1,54
24	354	22,88	419	1,43
25	291	67,35	266	16,17
26	340	4,41	313	0,96
27	347	38,90	218	99,54
28	355	3,10	312	69,87
29	324	62,35	215	74,88
30	268	9,33	359	6,69
31	355	19,18	227	80,62
32	304	16,45	296	66,22
33	341	0,88	220	96,82
34	284	10,92	263	90,11
35	270	8,15	176	30,68
36	220	1,82	294	11,90
37	239	15,90	346	4,05
38	403	0,99	444	5,86
39	332	7,53	306	3,92
40	316	2,22	330	0,30
41	339	2,65	348	5,75
42	319	4,39	354	3,39
43	315	2,54	363	55,37
44	252	3,97	245	33,06
45	282	68,44	362	17,13
46	229	3,06	276	9,06
47	275	6,91	346	1,45
48	229	2,62	268	5,60
49	120	5,83	68	14,71
50	135	0,00	176	32,39
51	141	2,84	74	6,76
52	84	2,38	181	3,31
53	104	0,96	46	82,61
54	89	17,98	143	87,41
55	105	0,95	51	0,00
56	101	1,98	160	11,25
57	63	1,59	56	12,50
58	78	2,56	117	2,56
59	55	1,82	38	0,00
60	56	3,57	134	37,31
61	265	33,58	295	76,61
62	234	58,12	178	0,30
63	235	3,40	267	0,38
64	157	20,38	158	7,59
65	186	53,23	209	26,32
66	157	7,01	203	24,63
67	155	50,32	136	37,50
68	167	10,18	118	1,69
69	145	8,27	175	2,86
70	146	4,79	119	16,81
71	153	3,92	220	21,82
72	144	4,86	96	6,25
73	112	51,79	204	9,80
74	146	0,68	126	11,90

TABELLE 13: Phytohämagglutinin - Kultur mit Bleiacetat (10^{-5} M)

Prozentsätze markierter Lymphozytenkerne und Mitoseindices in der Serie A.

h : Kulturdauer (Stunden)

N : Gesamtzahl ausgewerteter Kerne

P₀: markierte Lymphozytenkerne mit mehr als 20 Silberkörnern (%)

P₁: markierte Lymphozytenkerne mit 6-20 Silberkörnern (%)

P₂: markierte Lymphozytenkerne mit 1-5 Silberkörnern (%)

MI: Mitoseindex in Prozent

Für die Bestimmung des Mitoseindex wurden jeweils 1000 Zellen ausgewertet.

h	N	P ₀ (%)	P ₁ (%)	P ₂ (%)	MI (%)
26	200	2,00	0,00	12,00	
28	200	1,50	0,00	28,50	
30	300	10,67	0,00	23,00	
32	200	8,00	0,00	62,00	
34	200	14,50	0,00	49,00	
36	200	8,50	3,00	54,00	0,0
38	300	16,33	0,00	30,00	0,0
39	300	20,67	2,00	41,00	0,1
42	300	37,33	3,00	34,00	1,4
44	200	28,00	3,50	47,50	0,9
46	300	52,33	2,00	22,00	0,5
48	200	41,50	3,00	40,00	0,5
50	300	40,67	0,00	28,00	1,8
52	200	47,50	1,00	24,00	1,7
54	200	43,00	2,00	40,00	1,6
55	200	57,00	2,00	29,00	3,0

TABELLE 14: Phytohämagglutinin - Kultur mit Bleiacetat (10^{-5} M)

Prozentsätze markierter Lymphozytenkerne und Mitoseindices in der Serie B.

h : Kulturdauer (Stunden)

N : Gesamtzahl ausgewerteter Kerne

P₀: markierte Lymphozytenkerne mit mehr als 20 Silberkörnern (%)

P₁: markierte Lymphozytenkerne mit 6-20 Silberkörnern (%)

P₂: markierte Lymphozytenkerne mit 1-5 Silberkörnern (%)

MI: Mitoseindex in Prozent

Für die Bestimmung des Mitoseindex wurden jeweils 1000 Zellen ausgewertet.

h	N	P ₀ (%)	P ₁ (%)	P ₂ (%)	MI (%)
24	100	1,00	2,00	23,00	
26	100	1,00	0,00	18,00	
28	100	3,00	0,00	25,00	
30	100	7,00	0,00	38,00	
32	100	13,00	0,00	30,00	
34	200	3,00	5,00	38,00	
36	100	26,00	0,00	25,00	
38	100	22,00	2,00	14,00	
40	100	21,00	2,00	17,00	0,0
42	100	22,00	2,00	13,00	0,6
44	100	27,00	4,00	18,00	0,5
46	100	39,00	2,00	22,00	0,6
48	100	43,00	2,00	17,00	1,0
50	100	41,00	5,00	32,00	0,6

TABELLE 15: Phytohämagglutinin - Kultur mit Bleiacetat (10^{-5} M)

Prozentsätze markierter Lymphozytenkerne und Mitoseindices in der Serie C.

h : Kulturdauer (Stunden)

N : Gesamtzahl ausgewerteter Kerne

P₀ : markierte Lymphozytenkerne mit mehr als 20 Silberkörnern (%)

MI: Mitoseindex in Prozent

Für die Bestimmung des Mitoseindex wurden jeweils 1000 Zellen ausgewertet.

h	N	P ₀ (%)	MI (%)
23	500	0,20	
24	500	0,40	
25	500	1,20	
26	500	1,20	
27	500	0,60	
28	500	1,20	
29	500	3,80	
30	500	2,40	
31	500	9,60	
32	500	8,20	
33	500	4,20	
34	500	10,80	
35	500	13,60	
36	500	16,20	
37	500	21,60	0,0
38	1000	17,90	0,1
39	500	23,00	0,3
40	500	4,60	0,0
41	500	24,60	0,4
42	500	15,40	0,5
43	500	22,20	0,9
44	500	22,60	0,6
45	500	26,40	0,6
46	500	32,80	0,8
47	500	30,20	0,3
48	500	28,60	0,9
49	500	34,80	0,8
50	500	26,40	0,6
51	500	34,40	2,0
52	500	25,60	0,8

TABELLE 16: Phytohämagglutinin - Kultur mit Bleiacetat (10^{-5} M)

Prozentsätze markierter Lymphozytenkerne und Mitoseindices in der Serie D.

h : Kulturdauer (Stunden)

N : Gesamtzahl ausgewerteter Kerne

P₀: markierte Lymphozytenkerne mit mehr als 20 Silberkörnern (%)

MI: Mitoseindex in Prozent

Für die Bestimmung des Mitoseindex wurden jeweils 1000 Zellen ausgewertet.

h	N	P ₀ (%)	MI (%)
23	200	0,00	
24	200	0,00	
25	200	1,00	
26	200	2,50	
27	200	0,50	
28	200	1,50	
29	200	1,00	
30	200	1,50	
31	200	1,50	
32	200	9,00	
33	200	6,00	
34	200	4,00	
35	20	11,50	
36	200	12,50	
37	200	20,00	
38	500	16,00	0,0
39	500	15,60	0,6
40	500	14,00	0,2
41	500	23,20	0,8
42	500	22,80	0,4
43	500	15,00	1,0
44	500	22,80	0,2
45	500	19,60	0,8
46	500	26,20	1,2
47	500	31,00	0,6
48	500	23,40	0,8
49	500	26,00	1,0
50	500	27,00	1,0
51	500	28,00	1,4
52	500	23,20	2,0

TABELLE 17: Ham's F 10 - Medium + Aminosäuren

N : Gesamtzahl ausgewerteter Zellen

MI : Mitoseindex

$\overline{MI}$: Mittelwert der Mitoseindices = P_0

m : mittlere Abweichung des Mittelwertes

$$m = \pm \sqrt{P_0 \cdot (100 - P_0) / N}$$

$$s : \text{Streuung} \quad s = \pm \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2 + \sum (y - \bar{y})^2}{n + 1 - 2}} \left(\frac{1}{n} + \frac{1}{1} \right)$$

P : Wahrscheinlichkeit

SUBSTANZ	N	MI (%)	$\overline{MI}$ (%)	m	s	P
Kontrolle	2000	5,1				
Ham's F 10	1000	4,4				
	1000	4,1				
	1000	3,9				
	1000	1,7				
	1000	2,6				
	1000	5,5				
	1000	1,9				
	1000	4,3				
	2000	1,7				
	2000	3,4	3,509	$\pm 0,15554$	$\pm 1,3133$	
L-Asparagin	1000	4,4				
	1000	3,6	4,0	$\pm 0,4382$	$\pm 0,4$	0,68 n.s.
L-Arginin	1000	6,1				
	1000	5,8	5,95	$\pm 0,5289$	$\pm 0,15$	0,07 n.s.
L-Glutamin- säure	1000	4,2				
	1000	4,3	4,25	$\pm 0,4511$	$\pm 0,05$	0,54 n.s.
L-Cystein	1000	4,7				
	1000	7,3	6,0	$\pm 0,531$	$\pm 1,3$	0,07 n.s.
L-Cystein + L-Glutamin- säure	1000	6,9				
	1000	5,8	6,35	$\pm 0,5453$	$\pm 0,5501$	0,03zwei- felhaft

TABELLE 18: TC Medium 199 + Substanzen

Abkürzungen wie in Tabelle 17

SUBSTANZ	N	MI (%)	MI (%)	m	s	P
Kontrolle	2000	0,45				
TC Medium 199	2000	0,4				
	1000	0,6				
	1000	0,9	0,5875	$\pm 0,0987$	$\pm 0,1853$	
Na-Pyruvat	2000	0,6				
	2000	0,7	0,65	$\pm 0,1271$	$\pm 0,05$	0,72 n.s.
Vitamin B ₁₂	2000	0,3				
	2000	0,5	0,4	$\pm 0,0998$	$\pm 0,1$	0,39 n.s.
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	2000	0,2				
	2000	0,8				
	2000	0,6	0,53	$\pm 0,0937$	$\pm 0,2495$	0,8 n.s.
CuSO ₄ ·5H ₂ O	2000	0,35				
	2000	0,45	0,4	$\pm 0,0998$	$\pm 0,05$	0,325 n.s.
alle Substanzen						
zusammen	2000	0,45				
	2000	0,45				
	1000	2,00				
	1000	1,6	1,125	$\pm 0,1362$	$\pm 0,6849$	0,24 n.s.

Tabelle 19: Ham's F 10 - Kultur mit verschiedenen FBS-Konzentrationen

C (vol/vol)	N	MI(%)	M $\bar{I}$ (%)	m	s	P
Fetal Bovine Serum						
5%	2000	2,15				
	2000	3,2				
	1000	3,5				
	1000	2,8				
	1000	3,8	3,09	$\pm 0,2068$	$\pm 0,6033$	$< 0,3$ n.s.
10% = Kontrolle	2000	5,1				
	1000	4,4				
	1000	4,1				
	1000	3,9				
	1000	1,7				
	1000	2,6				
	1000	5,5				
	1000	1,9				
	1000	4,5				
	2000	1,7				
	2000	3,4	3,509	$\pm 0,15554$	$\pm 1,3133$	
15%	2000	1,5				
	2000	4,1				
	1000	3,5				
	1000	3,5				
	1000	6,4	3,8	$\pm 0,2285$	$\pm 1,590$	$< 0,3$ n.s.
20%	2000	2,25				
	2000	2,45				
	1000	1,00				
	1000	2,1				
	1000	5,2	2,6	$\pm 0,1902$	$\pm 1,1869$	$< 0,4$ n.s.
25%	2000	2,25				
	2000	3,05				
	1000	2,9				
	1000	4,5				
	1000	3,7	3,29	$\pm 0,2132$	$\pm 0,7619$	$< 0,3$ n.s.

Abkürzungen wie in Tabelle 17

C : Konzentration

Tabelle 20: Ham's F 10 - Kultur mit verschiedenen PHA-Konzentrationen

C (vol/vol)	N	MI(%)	MI(%)	m	s	P
Phytohämagglutinin						
0,8%	2000	1,45				
	2000	6,55				
	1000	2,5				
	1000	2,4				
	1000	1,3	2,84	$\pm 0,1985$	$\pm 2,2064$	$< 0,5$ n.s.
1,6%	2000	3,35				
	2000	2,15				
	1000	2,4				
	1000	2,6				
	1000	4,6	3,02	$\pm 0,2045$	$\pm 0,8272$	$< 0,5$ n.s.
2,4% = Kontrolle						
	2000	5,1				
	1000	4,4				
	1000	4,1				
	1000	3,9				
	1000	1,7				
	1000	2,6				
	1000	5,5				
	1000	1,9				
	1000	4,3				
	2000	1,7				
	2000	3,4	3,509	$\pm 0,15554$	$\pm 1,3133$	
4,8%	2000	1,35				
	2000	2,6				
	1000	1,4				
	1000	0,7				
	1000	2,1	1,63	$\pm 0,1513$	$\pm 0,2061$	0,02-0,03 Zweifelhaft
9,6%	2000	1,95				
	2000	1,25				
	1000	0,5				
	1000	1,1				
	1000	6,2	2,2	$\pm 0,1753$	$\pm 1,7741$	0,22 n.s.

Abkürzungen wie in Tabelle 17

C : Konzentration

VIII. FILMPROTOKOLL

Ham's F 10 - Phytohämagglutinin - Kulturen:

Szene	Kulturdauer (Stunden)	Gesamtzahl Stunden	Raffung	Blutspender
1 - Lymphozyt	48 ⁵⁶ - 57 ¹⁹	8 ⁴²	15"	DG (♀/1949)
2 - Lymphozyt	41 ⁰⁸ - 53 ⁵³	12 ¹⁵	"	"
3 - Lymphozyt	2 ²⁶ - 4 ⁴⁷	2 ²¹	"	S (♀/1928)
dito	22 ⁴⁴ - 26 ¹⁴	3 ³⁰	"	
dito	26 ¹⁶ - 28 ³⁵	2 ¹⁹	"	
4 - Lymphozyt	45 ⁵⁴ - 52 ⁴⁰	6 ⁴⁶	"	"
5 - Lymphozyt	0 ²² - 4 ⁴⁵	4 ¹³	"	"
dito	22 ⁴⁴ - 28 ³⁵	6 ⁰⁷	"	
dito	46 ⁰⁰ - 52 ⁴⁰	6 ⁴⁰	"	
dito	71 ¹⁴ - 76 ⁵²	5 ³⁸	"	
dito	92 ²² - 93 ³⁵	0 ⁵⁷	"	
dito	93 ³⁸ - 94 ⁵⁹	1 ²¹	"	
dito	98 ¹⁵ - 101 ⁰⁶	2 ⁵¹	"	
dito	116 ⁰⁰ - 118 ⁰⁶	2 ⁰⁶	"	
6 - Lymphozyt	42 ¹¹ - 44 ⁵⁹	2 ³⁸	"	P (♀)
7 - Lymphozyt	49 ⁵³ - 52 ⁵⁵	3 ⁰²	"	"
dito	75 ³⁵ - 75 ⁵¹	0 ¹⁶	"	
dito	93 ²⁰ - 94 ⁰⁰	0 ⁴⁰	"	
dito	118 ⁰⁵ - 118 ⁴²	0 ³⁸	"	
dito	127 ²¹ - 127 ⁵⁵	0 ³⁴	"	
dito	142 ⁰⁷ - 142 ⁵⁵	0 ⁴⁸	"	
dito	165 ⁵⁸ - 166 ⁴⁹	0 ⁵¹	"	
dito	193 ⁵⁰ - 194 ⁰⁴	0 ¹⁴	"	
8+9 - Lymphozyt	0 ²⁷ - 1 ¹⁵	0 ⁴⁸	"	Patient - häma-
dito	19 ⁴⁰ - 22 ⁴³	3 ⁰⁸	"	tologisch normal

Szene	Kulturdauer (Stunden)	Gesamtzahl Stunden	Raffung	Blutspender
dito	22 ⁵³ - 25 ¹²	2 ¹⁹	15"	dito
dito	43 ⁵³ - 48 ³⁰	4 ³⁷	"	
dito	48 ³⁰ - 65 ⁴⁵	17 ¹⁵	15'	

Ham's F 10 - Pokeweed Mitogen - Kulturen:

10 - Lymphozyt	2 ⁴⁰ - 4 ¹⁶	1 ³⁶	15"	(♀/1914)
11 - Lymphozyt	4 ²⁰ - 5 ⁵⁵	1 ³⁵	"	"
12 - Lymphozyt	0 ³⁵ - 1 ³⁰	0 ⁵⁵	"	GD (♀/1949)
13 - Lymphozyt	22 ²⁵ - 22 ⁴¹	0 ¹⁶	"	"
14 - Dreiergruppe von Lymphozyten - Mitose	24 ³⁰ - 25 ³⁵ 25 ³⁵ - 44 ⁵⁰	1 ⁰⁵ 19 ¹⁵	" 15'	"
15 - Lymphozyten- gruppe	0 ¹⁶ - 6 ¹⁵	5 ⁵⁹	15"	Z (♀/1915)
16 - Lymphozyt	0 ⁴⁵ - 5 ⁵⁵	5 ¹⁰	"	(♀/1914)
17 - Lymphozyt	21 ⁴⁹ - 25 ⁰⁰	3 ¹¹	"	GD (♀/1949)

Lebenslauf

Gertrud Dudin geb. Gross

2. 7.	1949	in Eppelborn / Saarland geboren
Herbst	1955	Aufnahme in die Volksschule in Dörsdorf (Saar)
Ostern	1960	Wechsel in das Staatl. Realgymnasium Lebach (Saar) - Neusprachliches Gymnasium
19. Juni	1968	Abitur
WS	1968/69	Immatrikulation an der Universität des Saarlandes in Biologie und Chemie
WS	1970/71	Wechsel zur Freien Universität Berlin Studium der Biologie
21. Januar	1971	Vorprüfung zur Diplomprüfung in Biologie (Zoologie, Genetik, Chemie, Physik)
14. Juli	1974	Diplomprüfung in Biologie, Hauptfach Allgemeine Biologie und Genetik
WS	1974/75	Beginn mit der Doktorarbeit am Institut für Genetik

Seit dem 31. Juli 1970 bin ich verheiratet.

4. 9. 1974 Geburt einer Tochter

Für die Bereitstellung der für die Filmaufnahmen benötigten
Geräte und das Filmmaterial danke ich Frau Prof. Irene Boll.

